

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 10 月 18 日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/76580 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 31/12, 31/216, 31/352, 31/7024,
A61P 25/00, 1/16, 43/00, A23L 1/30

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03075

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 10 日 (10.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-109983 2000 年 4 月 11 日 (11.04.2000) JP
特願2000-308524 2000 年 10 月 6 日 (06.10.2000) JP
特願2000-308525 2000 年 10 月 6 日 (06.10.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大野木宏
(OHNOGI, Hiromu) [JP/JP]; 〒 617-0002 京都府
向日市寺戸町渋谷 16-A-406 Kyoto (JP). 小林英
二 (KOBAYASHI, Eiji) [JP/JP]; 〒 520-2153 滋賀県

大津市一里山六丁目 18-19 Shiga (JP). 西村香織
(NISHIMURA, Kaori) [JP/JP]; 〒 520-0853 滋賀県大
津市蛸谷 1-13-205 Shiga (JP). 白髪正宏 (SHIRAGA,
Masahiro) [JP/JP]; 〒 520-2134 滋賀県大津市瀬田
2-1-15-103 Shiga (JP). 李 拖平 (LI, Tuo-Ping) [CN/JP];
〒 520-2193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 寶酒造株
式会社 中央研究所内 Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA,
Hiroaki) [JP/JP]; 〒 525-0025 滋賀県草津市西渋谷二
丁目6-32 Shiga (JP). 加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin)
[JP/JP]; 〒 611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto
(JP).

(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大
手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: Remedies or preventives for diseases, wherein the production of growth factor should be potentiated, and foods, drinks or feeds for potentiating the production of growth factor each containing, as the active ingredient, polyphenols, derivatives thereof and/or salts thereof or compositions obtained by subjecting polyphenols, derivatives thereof and/or salts thereof to (i) mixing with metals, metal salts and/or metal ions, or (ii) oxidation.

(57) 要約:

WO 01/76580 A1

本発明は、ポリフェノール類、その誘導体及び／又はその塩、またはポリフェノール類、その誘導体及び／又はその塩の (i) 金属、金属塩及び／又は金属イオンとの混合処理もしくは (ii) 酸化処理により得られる組成物を有効成分とする、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防のための治療剤および予防剤、ならびに成長因子産生増強用の食品、飲料および飼料を提供する。



LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

治療剤

技術分野

本発明は、ポリフェノール類、その誘導体および／またはそれらの塩を有効成分とする医薬、食品、飲料、または飼料に関する。

背景技術

ポリフェノール類は分子内に数個以上のフェノール性水酸基をもつ物質の総称であり、植物由来のものが多く知られている。広義にはフラボノイド類やクロロゲン酸、コーヒー酸、ジカフェオイルキナ酸、ガリックアシッド、プロアントシアニン、ガロタンニン等が含まれる。また、フラボノイド類は基本骨格によってさらに分類されており、フラボン、フラボノール類、フラバノン、アントシアニン、カルコン、イソフラボン、フラバノール、フラバノノール等、いくつかに分類することができ、フラボノール類としては、例えばミリセチン、ケルセチン等が挙げられる。フラバノールとしてはカテキン類、例えばエピガロカテキンガレート等が挙げられる。フラバノンとしてはイソキサントフモール等が挙げられる。カルコンとしてはキサントフモールB、キサントフモールD等が挙げられる。

ポリフェノール類の生理活性としては主に抗酸化活性が知られているが、成長因子産生増強活性については知られていない。

ヒトの知的機能、記憶、感情、行動などの精神活動の維持には神経細胞が主要な役割を担っている。これら精神活動の基になっている神経細胞の分化、生存、機能発現には、それぞれの神経細胞に特異的な神経栄養因子が必要であると考えられている。神経栄養因子のうち最初にその存在および機能が明らかにされたの

が神経成長因子 (Nerve Growth Factor、以下NGFと略する) であり、現在では脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic Factor)、ニューロトロフィン (Neurotrophin) - 3、ニューロトロフィン - 4/5などが見出されている。

NGFは前脳基底部の大細胞性コリン作動性神経細胞の神経栄養因子であることから、アルツハイマー型痴呆症との関連が注目されている〔ファルマシア、Vol. 22、No. 2、147~151 (1986)、老年精神医学、Vol. 3、No. 6、751~758 (1986)〕。アルツハイマー型痴呆症とは発育障害、巣症状、下肢の強直拘攣、てんかん様発作などの臨床を伴い、老人性ブランク、アルツハイマー原線維変化などの病理学的所見を見る疾患であり、老人性痴呆の一病型である。近年の高齢化社会で増加の傾向が見られ、重大な社会的関心が払われているが、これといった症状の改善法、治療法が見つかっていない。

アルツハイマー型痴呆症患者脳には、マイネルト基底核を中心とする前脳基底部に顕著な変性、コリンアセチル基転位酵素 (CAT) 活性の著しい低下が認められている〔Annu. Rev. Neurosci., Vol. 3, 77 (1980)〕。1985年にラット脳を用いた研究で、NGFが脳のこの部位での神経栄養因子であることが明らかにされ〔EMBO J., Vol. 4, 1389 (1985)〕、NGFと本疾患との関連が注目された。またハンチントン舞蹈疾患の脳の線条体では、GABA作動性神経細胞の脱落と共にコリン作動性神経細胞の脱落が著しく、NGFが線条体の内在性コリン作動性神経細胞にも作用することが明らかにされ〔Science, Vol. 234, 1341 (1986)〕、本疾患がNGFと関連している可能性が指摘されている。各種の神経疾患のモデルとなり得るラットなどの動物でNGFの効果が研究され、ラットでは神経細胞の変性が顕著になる以前にNGFを脳内投与すれば、変性を食い止めることができ、CAT活性の低下も防げることが報告されている〔J. Neuro

sci., Vol. 6, 2155 (1986)、Brain Res., Vol. 293, 305 (1985)、Science, Vol. 235, 214 (1986)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 9231 (1986)〕。末梢の交感神経支配組織および脳でNGFが生合成されていること、このNGFの生合成に末梢組織あるいは脳組織の間質細胞である線維芽細胞あるいはアストログリア細胞が各々重要な役割を担っていることも証明されている〔J. Biol. Chem., Vol. 259, 1259 (1984)、Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 136, 57 (1986)〕。また、この線維芽細胞やアストログリア細胞の産生するNGFの抗原性、分子量、等電点、生物活性は、従来よく研究されていた顎下腺NGFと同一であることが明らかにされるとともに、線維芽細胞(L-M細胞)およびアストログリア細胞の培養液に種々の神経伝達物質を加える実験によって、カテコールアミン類(ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン)がNGF産生増強作用を示すことが見出されている〔J. Biol. Chem., Vol. 261, 6039 (1986)〕。

NGFは、NGFが神経栄養因子として作用する部位が変性する神経疾患において、変性を食い止める治療薬として用いることができるのではないかと期待される。また、脳血管障害、脳腫瘍、脳尖、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒など脳神経細胞が一旦変性に陥れば、生涯回復することがなく、その結果、知的機能低下、記憶障害のみならず、感情障害、行動異常など様々な障害を引き起こすが、神経線維には可塑性があり、損傷を受けると、その付近の健常な線維から発芽が起こり、障害されたシナプスに変わって新しいシナプスが形成されるので、この時NGFが神経機能の修復再生を促す治療剤として用いることができるのではないかと期待される。

しかしながら、NGFを各種神経疾患の治療に応用しようとした場合、NGFはNGFを必要とする神経細胞の極く近傍に達していなければならないし、中枢

神経疾患の場合も脳細胞の患部にNGFを送り届けなければならないが、血管系を通してNGFを脳内に送り込むことはできない。なぜならば、脳内の血管内皮細胞は、互いに密着結合で結合しており（脳血液関門という）、水、ガス、脂溶性物質以外の物質の血液から脳組織への移行は制限を受けているからであり、高分子物質であるタンパク質（NGFも含む）はまったく脳血液関門を通ることが出来ないからである。このNGFを直接脳内に外科的手法を用いて投入することは、現在の技術をもってしても危険が大き過ぎる。

一方、直接、NGFを投与するのではなく、NGFの産生を増強する物質の開発も行われているが、その多くは、強い毒性を有するか、毒性が出る濃度と有効な濃度が非常に接近した物質、または神経興奮作用など神経系に対して重大な副作用を生じる物質であるなど、多くの問題点を抱えており、未だ実用化には至っていない。

部分肝切除を受けた肝臓は、速やかに再生し、もとのサイズになる。この肝再生因子の本体は、長年不明であったが、劇症肝炎患者の血漿中に肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor : HGF）が見出され、その患者血漿から、単離、精製された（Gohda, E. et al. : J. Clin. Invest. , 88 414 —419 , 1988）。さらに、ヒトHGFのcDNAもクローニングされ、HGFの1次構造も明らかにされた（Miyakawa, K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. , 163 967-973, 1989）。また、細胞の運動性を亢進させるscatter factor (SF) および、腫瘍細胞障害因子であるtumor cytotoxic factor (TCF) とHGFが同一物質であることも明らかになった（Weidner, K. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 7001-7005, 1991, Shima, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. , 180 1151-1158, 1991）。

HGFは肝細胞だけでなく胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞など多くの上皮細胞の増殖を促進させる。また、上皮細胞の運動性の亢進や血管新生、上皮細胞の管腔形成で見られるような形態形成を誘導し、HGFは極めて多彩

な生理活性を示す多機能活性物質である。つまり、HGFは様々な臓器において、その臓器の障害を修復する際の上皮細胞の増殖促進、運動性の亢進や血管新生などの形態形成の誘導等を行う。

HGFは肝細胞増殖作用、タンパク質合成促進作用、胆汁うっ滞改善作用、さらには薬剤による腎障害の予防作用などを示す。HGFのmRNAは脳、腎臓、肺等でも合成されている。HGFは、胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞など多くの上皮細胞の増殖を促進させる中胚葉性細胞成長因子であり、障害を修復する際の上皮細胞の増殖促進や、運動性の亢進、血管新生などの形態形成の誘導など極めて多彩な生理活性を示す多機能活性物質である。さらに、HGFは神経細胞の保護、増殖促進、障害修復作用なども持ち合わせている。従って、HGFの産生を増強することにより、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療又は予防を行うことができると期待されている。

HGFは前記各種作用を示すことから、HGF自身が、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療薬として期待されているが、HGFそのものを治療薬として実用化するには至っていない。さらに、遺伝子治療でHGFの遺伝子を導入する方法も試みられているが、不必要な時期、場所で作用することによる副作用により、これも実用化には遠い。このように、HGFを外から投与するのではなく、任意に増強できるのであれば、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等のHGF産生増強を必要とする疾患の治療及び予防に有効であると考えられているが、未だ実用化には至っていない。

このように、成長因子を増強することで当該成長因子に関連する種々の疾患の

治療または予防が可能になると考えられるが、毒性や副作用を示さず、所望により適切に成長因子の産生増強を行い得る物質、手段等は未だ知られていない。

発明の開示

本発明者らは鋭意検討した結果、ポリフェノール類、その誘導体またはそれらの塩が、成長因子産生増強作用を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

〔１〕 （ｉ）ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種、あるいは

（ｉｉ）ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種の、

（Ａ）金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも１種との混合処理、または

（Ｂ）酸化処理

により得られる組成物、

を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤、

〔２〕 ポリフェノール類がフラボノイド類、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、コーヒー酸およびジカフェオイルキナ酸からなる群より選択される少なくとも１種である前記〔１〕記載の治療剤または予防剤、

〔３〕 フラボノイド類がフラボノール類、フラバノン、カルコンおよびフラバノールからなる群より選択される少なくとも１種である前記〔２〕記載の治療剤または予防剤、

〔４〕 フラボノール類がミリセチンおよび／またはケルセチンであり、フラバノンがイソキサントフラモンであり、カルコンがキサントフラモンBおよび／ま

たはキサントフモールDであり、フラバノールがエピガロカテキンガレートである前記〔3〕記載の治療剤または予防剤、

〔5〕 ポリフェノール類の誘導体がポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である前記〔1〕～〔4〕いずれか記載の治療剤または予防剤、

〔6〕 ポリフェノール類のカルボン酸エステルがコーヒー酸メチルエステルおよび／またはコーヒー酸エチルエステルであり、ポリフェノール類の配糖体がイソオリエンチンである前記〔5〕記載の治療剤または予防剤、

〔7〕 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも1種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオンである前記〔1〕～〔6〕いずれか記載の治療剤または予防剤、

〔8〕 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である前記〔1〕～〔7〕いずれか記載の治療剤または予防剤、

〔9〕 (i) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種、あるいは

(ii) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種との混合処理、または

(B) 酸化処理

により得られる組成物、

を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強用の食品、飲料または飼料、

〔10〕 ポリフェノール類がフラボノイド類、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、コーヒー酸およびジカフェオイ

ルキナ酸からなる群より選択される少なくとも1種である前記〔9〕記載の食品、飲料または飼料、

〔11〕 フラボノイド類がフラボノール類、フラバノン、カルコンおよびフラバノールからなる群より選択される少なくとも1種である前記〔10〕記載の食品、飲料または飼料、

〔12〕 フラボノール類がミリセチンおよび／またはケルセチンであり、フラバノンがイソキサントフラモンであり、カルコンがキサントフラモンBおよび／またはキサントフラモンDであり、フラバノールがエピガロカテキンガレートである前記〔11〕記載の食品、飲料または飼料、

〔13〕 ポリフェノール類の誘導体がポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である前記〔9〕～〔12〕いずれか記載の食品、飲料または飼料、

〔14〕 ポリフェノール類のカルボン酸エステルがコーヒー酸メチルエステルおよび／またはコーヒー酸エチルエステルであり、ポリフェノール類の配糖体がイソオリエンチンである前記〔13〕記載の食品、飲料または飼料、

〔15〕 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも1種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオンである前記〔9〕～〔14〕いずれか記載の食品、飲料または飼料、

〔16〕 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である前記〔9〕～〔15〕いずれか記載の食品、飲料または飼料、

〔17〕 ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種との混合処理、または

(B) 酸化処理

により得られる組成物、

〔１８〕 ポリフェノール類がクロロゲン酸および／またはコーヒー酸であり、誘導体が前記ポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である前記〔１７〕記載の組成物、

〔１９〕 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも１種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオンである前記〔１７〕または〔１８〕記載の組成物、

〔２０〕 成長因子産生増強作用を有する前記〔１７〕～〔１９〕いずれか記載の組成物、

〔２１〕 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である前記〔２０〕記載の組成物、
に関する。

図面の簡単な説明

第１図は、アシタバ根部由来フラクション１８－３のMSスペクトルである。

第２図は、アシタバ根部由来フラクション１８－３の¹H-NMRスペクトルである。

第３図は、アシタバ根部由来フラクション２８のMSスペクトルである。

第４図は、アシタバ根部由来フラクション２８の¹H-NMRスペクトルである。

第５図は、キサントフモールフラクション由来のフラクションA－５のMSスペクトルである。

第６図は、キサントフモールフラクション由来のフラクションA－５の¹H-NMRスペクトルである。

発明を実施するための最良の形態

本発明における有効成分は、(i) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種（以下、ポリフェノール類等という場合がある）、あるいは(ii) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の、(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種との混合処理、または(B) 酸化処理により得られる組成物である。当該有効成分の成長因子産生増強作用は、ポリフェノール類、その誘導体またはそれらの塩により奏されるものであり、それらは簡便に製造でき、その種々の生理機能により医薬、食品等の広い分野において極めて有用である。また、当該ポリフェノール類等は前記(A) または(B) の処理を行うことにより、その成長因子産生増強作用が増強される。従って、前記組成物は、本発明の有効成分としてより好ましいものである。前記ポリフェノール類等の成長因子産生増強作用ならびに当該ポリフェノール類等の前記処理による前記作用の増強は本発明において初めて見出されたものである。

なお、本明細書において、「成長因子産生増強作用」および「成長因子産生増強活性」はそれぞれ成長因子産生増強をもたらすことおよび成長因子産生を増強する機能をいうが、その意味において特に厳密に区別するものではない。「増強」には、本発明に係る有効成分の作用前に比し、作用後において目的物質の量が増加するという態様と共に、本発明に係る有効成分を作用させることにより目的物質を生起せしめるという態様（誘導）を含む。また、本明細書において、有効成分として挙げるいずれの物質も単独でもしくは2種以上混合して本発明において用いることができる。

本発明で使用するポリフェノール類は成長因子産生増強作用を有するものであれば特に限定はない。たとえば、フラボノール類、カルコン、イソフラボン、アントシアニン、フラバノール、フラバノン、フラボン、オーロン、フラバノノール等のフラボノイド系に分類されるもの、ガリックアシッド、クロロゲン酸、ク

リプトクロゲン酸、ネオクロゲン酸、コーヒー酸、エラグ酸、ジカフェオイルキナ酸等の非フラボノイド系に分類されるもののいずれもが使用できる。また、プロアントシアニン等の縮合型、ガロタンニン、エラグタンニン等の加水分解型のポリマーポリフェノールも本発明のポリフェノールに包含される。本発明の所望の効果の発現の観点から、ポリフェノール類としては、好ましくはフラボノイド類、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロゲン酸、ネオクロゲン酸、コーヒー酸およびジカフェオイルキナ酸からなる群より選択される少なくとも1種である。ジカフェオイルキナ酸としては特に好適には3, 5-ジカフェオイルキナ酸である。また、前記フラボノイド類としては、好ましくはフラボノール類、フラバノン、カルコンおよびフラバノールからなる群より選択される少なくとも1種である。前記フラボノール類としては、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン等があり、好ましくはミリセチンおよび／またはケルセチンである。前記フラバノンとしては、好ましくはイソキサントフモールである。前記カルコンとしては、好ましくはキサントフモールBおよび／またはキサントフモールDである。前記フラバノールとしては、カテキン類等があり、好ましくはエピガロカテキンガレートである。また、成長因子産生増強作用を有する限り、光学異性体、ケト-エノール互変異性体、幾何異性体等の各種異性体も本発明において使用することができ、各異性体の単離されたものであっても、その混合物であってもよい。本発明で使用するポリフェノール類は公知の方法で製造することができ、たとえば植物（たとえば、ヨモギ、アシタバ、タケ、プラム、コメ、ダイズ、キク、シュンギク、ホップ、モロヘイヤ、紫ウコン、ウコン等）の果実、種子、種皮、花、葉、茎、根または根茎から分離、精製することができる。また、市販のポリフェノール類を使用することもできる。また、ポリフェノール類の含有されている植物の抽出物をそのまま使用することもできる。

本発明におけるポリフェノール類の誘導体としては特に限定はないが、たとえば、ポリフェノール類のカルボン酸エステル、配糖体、硫酸化体等が例示され、

成長因子産生増強作用を有していれば、いずれも本発明に使用することができる。当該誘導体としてはポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体が好ましい。前記ポリフェノール類のカルボン酸エステルとしては、たとえば、脂肪族基、芳香族基または芳香脂肪族基を有するカルボン酸とのエステルが例示される。当該カルボン酸は不飽和の炭化水素を有するもの、水素原子がハロゲンや官能基、たとえば、水酸基、アミノ基、オキシ基等に置換されたものであってもよい。ポリフェノール類に存在するフェノール性水酸基の全部にカルボン酸とのエステルが形成されたものであっても、当該水酸基が一部残存するものであってもよい。ポリフェノール類のカルボン酸エステルとしては、ポリフェノール類として前記例示した、有効成分として好適な化合物のカルボン酸エステルが好ましく、より好適にはコーヒー酸のカルボン酸エステルであるコーヒー酸メチルエステルおよび／またはコーヒー酸エチルエステルである。また、フラボノイド類である、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDまたはエピガロカテキンガレートのカルボン酸エステルはいずれも好ましい。

また、ポリフェノール類の配糖体としては、たとえば、グルコース、スレオース、リボース、アピオース、アロース、ラムノース、アラビノピラノース、リブロース、キシロース、ガラクトース、マンノース、タロース、フコース、フルクトース、グルクロン酸、ガラクトツロン酸等の単糖、ネオヘスペリドース、ルチノース、アガロビオース、イソマルトース、スクロース、キシロビオース、ニゲロース、マルトース、ラクトース等の二糖、およびアガロース、フコイダン等の多糖等の配糖体が挙げられる。また、配糖体としては、当該ポリフェノール類と糖とがO-、N-、S-、またはC-グリコシド結合した化合物の他に、糖の還元末端以外の炭素とC-C結合により結合した化合物をも含む。ポリフェノール類の配糖体としては、フラボンの1種であるルテオリンの配糖体であるイソオリエンチンが好ましい。また、ポリフェノール類の配糖体としては、ポリフェノール

類として前記例示した、有効成分として好適な化合物の配糖体が好ましい。また、フラボノイド類である、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDまたはエピガロカテキンガレートの配糖体はいずれも好ましい。

さらに、ポリフェノール類の誘導体には、たとえば、生体内での加水分解反応により成長因子産生増強作用を発揮し得るようになる、いわゆるプロドラッグとして機能するような化合物も包含される。

以上のポリフェノール類の誘導体は、公知の方法により適宜製造することができる。

本発明に係るポリフェノール類または誘導体の塩としては、たとえば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基との塩等が例示される。たとえば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、またはジエタノールアミン、エチレンジアミンとの塩等が挙げられる。これらの塩は、たとえば、ポリフェノール類のフェノール性水酸基等を公知の方法により塩に変換することで得られる。かかる塩としては薬理学的に許容され得る塩が好ましい。

また、本発明の有効成分としては前記組成物、すなわち、ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種との混合処理、または

(B) 酸化処理

により得られる組成物が好適に用いられる。前記(A)または(B)の処理により、前記ポリフェノール類等の成長因子産生増強作用が増強される。従って、当該組成物は、前記ポリフェノール類等に比し、有効成分としてより好適である。なお、ポリフェノール類等としては、ポリフェノール類として前記例示した、有効成分として好適な化合物、当該化合物の誘導体ならびにそれらの塩を挙げるこ

とができるが、中でもクロロゲン酸および／またはコーヒー酸、それらの誘導体ならびにそれらの塩が好ましい。また、誘導体としては、クロロゲン酸および／またはコーヒー酸のカルボン酸エステルおよび／または配糖体が好ましい。かかる組成物自体も本発明に包含される。

本発明で使用される金属としては特に限定はないが、好ましくは鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、およびコバルトからなる群より選択される少なくとも1種の金属元素単体を挙げることができる。金属塩としては、好ましくは前記金属を含んでなる塩であり、たとえば、当該金属との硫酸塩、酢酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、塩化物等を挙げることができる。また、錯イオンを含む錯塩を使用することもできる。金属イオンとは、これらの金属および／または金属塩を、たとえば、水性液中に溶解して生成する金属イオンをいい、好ましくは Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Ag^{2+} 、 Au^{+} 、 Au^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} および Co^{3+} からなる群より選択される少なくとも1種を使用する。

前記ポリフェノール類等の(A)金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種(以下、金属等という場合がある)との混合処理は、前記ポリフェノール類等と金属等を接触させることにより行う。たとえば、適当な溶媒中においてポリフェノール類と金属塩とを、モル比(ポリフェノール類／金属塩)で好ましくは0.01～10000、より好ましくは1～100となるように混合し、好ましくは0～100℃、より好ましくは室温(25℃)にて、好ましくは5分～10日間、より好ましくは30分～1日間放置することにより行う。当該溶媒としては、たとえば、水、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を、単独で、もしくは混合液として用いることができ、好ましくは水を用いる。混合

処理においては、処理対象のポリフェノール類等と金属等が共に溶媒に溶解しているのが好ましい。また、植物からポリフェノール類を抽出する工程において、上記混合処理を付すことにより、前記組成物を得ることもできる。たとえば、抽出溶媒中に前記金属等を添加しておき、抽出後、たとえば、数分～数時間放置することによっても前記組成物を得ることができる。

混合処理により得られる組成物の構造は不明であるが、たとえば、ポリフェノール類等と金属等が何らかの結合により、たとえば、錯体として生成していたり、また、結合はなく単に混合された状態で存在していること等が推測される。

前記ポリフェノール類等の（Ｂ）酸化処理は、たとえば、ポリフェノール類を、酸素との接触による酸化、酸化剤による酸化、酸化酵素による酸化、電氣的に酸化等の工程に供することにより行う。いずれも公知の方法に従って行うことができる。たとえば、酸素との接触により酸化を行う場合、水溶液中に溶解させたポリフェノール類に対し、ポンプを通して空気を送りこむことにより行うことができる。酸化剤による酸化は、酸化剤として好適には過酸化水素、オゾン、銀、銅、鉄、ニッケル、マンガン、コバルト、クロム等を用いて行うことができる。酸化酵素による酸化は、酸化酵素として好適にはチロシナーゼ、ペルオキシダーゼ等を使用して行うことができる。なお、酸化酵素による酸化には、前記例示する酸化酵素を含む微生物による酸化も包含される。また、電氣的に酸化を行う場合、たとえば、白金、酸化鉛、炭素、グラファイト、酸化白金等を電極に用いる陽極酸化反応により酸化することができる。

酸化処理により得られる組成物の構造は不明であるが、ポリフェノール類等が単に酸化され、もしくは重合されてポリマーとして存在していること等が推測される。

なお、有効成分として用いられる組成物は前記（Ａ）または（Ｂ）の処理を経て得られたものであれば特に限定はなく、従って、前記（Ａ）または（Ｂ）の処理工程を含む処理方法〔すなわち、前記（Ａ）または（Ｂ）の処理工程以外の工

程を含む処理方法〕により得られたものも用いることができる。また、前記処理後の前記ポリフェノール類等は処理後そのまま組成物として使用されるが、一方、所望の効果が得られる限り、公知の精製工程に従って所望により精製して使用してもよい。

本発明に係る有効成分は、公知の成長因子産生増強作用を有する物質と組み合わせて使用することもでき、さらにポリフェノール類等の金属等との混合処理により得られる組成物とポリフェノール類等の酸化処理により得られる組成物とを組み合わせ使用することもできる。

本発明に係る有効成分は、前記するように、いずれのものも成長因子産生増強作用を有するものである。当該作用の発現は、たとえば、後述の実施例 1 および 17 に示す方法により評価することができる。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切に成長因子の産生増強を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の治療剤、予防剤、食品、飲料または飼料は、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防に有効である。

本発明において、成長因子とは細胞の成長を促進する活性を有していれば特に限定はないが、肝細胞増殖因子（HGF）、神経成長因子（NGF）、神経栄養因子、上皮成長因子、ミルク由来成長因子、線維芽細胞成長因子、脳由来線維芽細胞成長因子、酸性線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、血小板塩基性タンパク質、結合組織活性化ペプチド、インスリン様増殖因子、コロニー形成刺激因子、エリスロポエチン、スロンボポエチン、T細胞成長因子、インターロイキン類（たとえば、インターロイキン 2、3、4、5、7、9、11、15）、B細胞成長因子、軟骨由来因子、軟骨由来成長因子、骨由来成長因子、骨格成長因子、内皮細胞成長因子、内皮細胞由来成長因子、眼由来成長因子、精巣由来成長因子、セルトリ細胞由来成長因子、乳腺刺激因子、脊髄由来成長因子、マクロフ

ァージ由来成長因子、リサイクル間葉成長因子、形質転換増殖因子- α 、形質転換増殖因子- β 、ヘパリン結合性EGF様増殖因子、アンフィレグリン、SDGF、ベーターセルリン、エプレグリン、ニューレグリン1、2、3、血管内皮増殖因子、ニューロトロフィン、BDNF、NT-3、NT-4、NT-5、NT-6、NT-7、グリア細胞株由来神経栄養因子、幹細胞因子、ミッドカイン、プレイオトロフィン、Ephrin、Angiopoietin、アクチビン、腫瘍壊死因子、インターフェロン類等が例示される。本発明によれば、特に神経成長因子(NGF)または肝細胞増殖因子(HGF)を好適に産生増強することができる。

HGFは肝細胞の再生因子であり、さらに細胞の運動を亢進させる因子、および腫瘍細胞障害因子でもある。HGFは肝細胞だけでなく胆管上皮細胞、腎尿管上皮細胞、胃粘膜細胞等、多くの上皮細胞の増殖を促進させる。また、HGFは、上皮細胞の運動性亢進や血管新生、上皮細胞の管腔形成で見られるような形態形成を誘導する等、極めて多彩な生理活性を示す。従って、HGFの産生を増強することにより、たとえば、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療または予防を行うことができる。

一方、NGFは神経細胞の生存や機能を維持したり、NGFの濃度勾配に従って神経細胞を伸長させたりする内因性の成長因子であり、NGFの産生を増強することにより、アルツハイマー病等の老人痴呆症や末梢神経障害、脳血管障害、脳腫瘍、脳尖、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒等による神経機能の修復・再生を要する疾患の治療または予防を行うことができる。また、筋萎縮性側索硬化症、薬剤障害性末梢神経障害、糖尿病性末梢神経障害、パーキンソン病、感覚神経障害、色素性網膜症、黄斑変性症等の治療または予防にも有用である。

本発明における成長因子の産生増強を必要とする疾患としては、前記有効成分を含有してなる治療剤、予防剤等により成長因子の産生増強を行うことで治療ま

たは予防が可能な疾患であれば特に限定されるものではないが、前記例示したHGFまたはNGFを産生増強することにより治療または予防することができる各種疾患に対し特に有効である。

本発明の成長因子の産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤としては、本発明に係る前記有効成分を公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬学的に許容され得る塩を用いる。

本発明の治療剤または予防剤の製造は、通常、前記有効成分を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

医薬用担体は、治療剤または予防剤の投与形態および剤型に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤とする場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、たとえば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などが利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などを配合することもできる。たとえば、錠剤または丸剤とする場合は、所望によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの糖衣または胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤とする場合は、薬理学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などとすることができ、たとえば、精製水、エタノールなどが担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。

一方、非経口剤とする場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤とし

ての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

外用剤としては、経皮投与用または経粘膜（口腔内、鼻腔内）投与用の、固体、半固体状または液状の製剤が含まれる。また、座剤なども含まれる。たとえば、乳剤、ローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などの液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤などの経皮投与用または経粘膜投与用の貼付剤などとすることができる。

以上の各種製剤は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる製剤における有効成分の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。

本発明の治療剤および予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用および注射によることができる。注射剤は、たとえば静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用剤では、たとえば、座剤をその適する投与方法により投与すればよい。

本発明の治療剤または予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的および当該治療剤または予防剤の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。一般には、製剤中に含有される前記有効成分の投与量で、好ましくは成人1日当り $0.1 \mu\text{g} \sim 200 \text{mg/kg}$ 体重である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行ってもよい。また、本発明の治療剤または予防剤はそのまま経口投与するほか、任

意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

また、本発明の別の態様として、本発明に係る前記有効成分を含む成長因子産生増強剤を提供することもできる。当該増強剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬理学的に許容される塩が好適である。成長因子産生増強剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。かかる増強剤における前記有効成分の含有量は、当該増強剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。また、該増強剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得るようであれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。成長因子産生増強剤は、成長因子産生増強、特にHGFまたはNGF産生増強を必要とする疾患における当該成長因子の増強に有用である。また、該増強剤は成長因子に関連する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。また、該増強剤は、上皮細胞活性化方法に使用することができ、該方法は上皮細胞機構に関する生化学的研究や、肝臓障害、腎臓障害、胃腸障害、血管障害の薬物スクリーニングに有用である。また、該増強剤は、成長因子の機能研究にも有用である。

さらに、本発明の別の態様として、本発明に係る前記有効成分を動物に投与する成長因子産生の増強方法を提供することもできる。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬理学的に許容される塩が好適である。かかる方法は、成長因子産生の増強が必要であると予想される、または、その必要のある動物に対し、前記有効成分を、好ましくは、前記成長因子産生増強剤として投与することにより行うことができ、かかる投与により、成長因子の産生を増強せしめる。有

効成分の投与方法、投与量などは、前記成長因子産生増強剤の場合と同様とすればよい。なお、成長因子産生の増強方法では、本発明の治療剤または予防剤、後述の食品、飲料または飼料を用いることもできる。また、「動物」としては、たとえば、哺乳動物であるヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ等を挙げることができ、中でも、ヒトに対し好適に用いられる。かかる成長因子産生の増強方法は、たとえば、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防における成長因子産生増強に有用である。また、該増強方法は、成長因子に関連する疾患に対する薬物のスクリーニングに有用である。また、該増強方法は、成長因子の機能研究にも有用である。

また、本発明は、前記有効成分を含有してなる成長因子産生増強用の食品、飲料または飼料を提供する。本発明の態様においては、有効成分の塩としては、薬学的に許容される塩、またはそれと同等の安全性を有する塩が好適である。本発明の食品、飲料または飼料は、その成長因子産生増強作用により、成長因子産生増強を必要とする疾患の症状改善、予防に極めて有用である。

なお、本発明の態様において、「含有」の語は、含有、添加、希釈の意を含むものであり、「含有」とは食品、飲料または飼料中に本発明で使用する有効成分が含まれるという態様を、「添加」とは食品、飲料または飼料の原料に、本発明で使用する有効成分を添加するという態様を、「希釈」とは本発明で使用する有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の食品、飲料または飼料の製造法に特に限定はない。たとえば、配合、調理、加工などは一般の食品、飲料または飼料のものに従えばよく、それらの製造法により製造することができ、得られた食品、飲料または飼料に成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分が含有されていれば良い。

本発明の食品または飲料としては特に限定はないが、たとえば、本発明に係る前記有効成分が含有されてなる、穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品

、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅など）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシングなど）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆など）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージなど）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮など）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリームなど）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料など）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類など）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュールなど）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料など）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりんなど）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥または濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープなど）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテルなど）、固形食品、液体食品（スープなど）、香辛料類などの農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品などが挙げられる。

本発明の食品または飲料には前記有効成分が単独もしくは複数含有、添加および／または希釈されており、その成長因子増強作用を発現するための必要量が含まれていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品または飲料中の前記有効成分の含有量は特に限定されず、その官

能と作用発現の観点から適宜選択できるが、たとえば、食品100重量部当たり好ましくは0.0001重量部以上、より好ましくは0.001～10重量部であり、たとえば、飲料100重量部当たり好ましくは0.0001重量部以上、より好ましくは0.001～10重量部である。また、本発明の食品または飲料は、好ましくは、それらに含有される有効成分が、たとえば、成人1日当たり0.01～100mg/kg体重摂取できるように摂取すればよい。

また、本発明は、前記有効成分を含有、添加および／または希釈してなる、成長因子産生増強作用を有する生物用の飼料を提供するものであり、さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。

これらの発明において、生物とはたとえば養殖動物、ペット動物などであり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類または貝類が例示される。飼料としては体調の維持および／または改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分の成長因子産生増強作用に基づき、本発明の前記治療剤または予防剤と同様の効果の発現が期待できる。すなわち、これらの発明により、当該生物における成長因子産生増強作用を要する疾患の治療または予防効果を期待できる。

本発明に使用される前記有効成分は通常、対象生物の体重1kg、1日当たり好ましくは0.01～2000mg投与される。投与は、たとえば、当該有効成分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加混合することで行うことができる。また、前記有効成分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、0.001～15重量%の割合が好適

である。

人工配合飼料としては、魚粉、カゼイン、イカミールなどの動物性原料、大豆粕、小麦粉、デンプンなどの植物性原料、飼料用酵母などの微生物原料、タラ肝油、イカ肝油などの動物性油脂、大豆油、菜種油などの植物性油脂、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、抗酸化剤などを原料とする人工配合飼料が挙げられる。また魚肉ミンチなどの魚類用飼料が挙げられる。

本発明の飼料の製造法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中に成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。

また、成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分をプール、水槽、保持タンクまたは飼育領域の水、海水などに直接、添加し、対象生物を浸漬することにより、投与することもできる。この浸漬方法は対象生物の飼料摂取量が低下したときに特に有効である。水または海水中の成長因子産生増強作用を有する本発明に係る有効成分の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、好ましくは0.00001～1重量%の割合が適当である。

また、成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分を含有する飲料を飼育用飲料として対象生物に摂取させても良い。該飲料中の成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される有効成分の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.00001～1重量%の割合が適当である。成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分を含んでなる生物飼育用剤、たとえば浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤はそれ自体公知の配合および製造法で製造すれば良い。該生物飼育用剤における有効成分の含有量は、本発明の所望の効果が得られ得る限り特に限定されるものではない。

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、マダ

イ、イシダイ、ヒラメ、カレイ、ブリ、ハマチ、ヒラマサ、マグロ、シマアジ、アユ、サケ・マス類、トラフグ、ウナギ、ドジョウ、ナマズなどの魚類、クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミなどの甲殻類など、アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキなどの貝類、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられ、陸上・水中動物に広く適用できる。

成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させること、または成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分の含有液に対象生物を浸漬させることにより、家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類、貝類、ペット動物などの体調を良好に維持し、または、改善させたりすることができる。

さらに、本発明の別の態様として、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤もしくは予防剤、成長因子産生増強剤、または成長因子産生増強用の食品、飲料もしくは飼料の製造における本発明に係る前記有効成分の使用を提供する。かかる使用の態様としては、本発明の前記治療剤もしくは予防剤、成長因子産生増強剤、または成長因子産生増強用の食品、飲料もしくは飼料の製造における前記有効成分の使用の態様を挙げることができる。たとえば、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤もしくは予防剤、または成長因子産生増強剤の製造における、前記有効成分の使用としては、前記のような錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤などの固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤などの液剤、また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品の製造においての使用が例示される。

本発明で使用される前記有効成分は、その作用発現にとっての有効量の投与を行っても毒性は認められない。たとえば経口投与の場合、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD、エピガロカテキンガラート、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、コーヒー酸、ジカフェオイルキナ酸、イ

ソオリエンチン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステルもしくはこれらの光学活性体又はそれらの塩のいずれかを1 g/kgでマウスに単回投与しても死亡例は認められない。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、特段の事情がない限り実施例における%は重量%を意味する。また、フラクションを画分という場合がある。

実施例1 ミリセチンおよびケルセチンのHGF産生増強活性

5×10^4 cells/cm² となるように10%牛胎仔血清を含んだDME培地に懸濁したMRC-5細胞(CCL 171:大日本製薬社製、code. 02-021)を48穴の細胞培養プレートに入れ、37℃、5%CO₂存在下で24時間培養後に培地交換した。その後、試料を添加し、さらに24時間培養した後、培地を回収し、Quantikine Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) ELISA Kit (フナコシ社製、Code. RS-0641-00)を用いて、培地中のHGFの量を測定した。試料として、ミリセチン(試料①)を最終濃度が0、1、10、100 μMになるように、ケルセチン(試料②)を0、10、100 μMになるように添加した。なお、試料の添加は、予め種々の濃度の試料水溶液を調製して培地に対し一定量添加し、前記最終濃度となるようにして行った。蒸留水のみを一定量添加したもの(試料の最終濃度が0 μM)を対照とし、当該細胞培養液中のHGF濃度を100%として相対値(%)によりHGF産生量を表した。その結果を表1に示す。実験は全て2連で行いその平均値を採用した。表1に示したように、試料①、②は、HGFの産生を増強した。さらに、フラボノールのB環の水酸基の数が多いミリセチンの方がHGF産生増強活性は強かった。

このことより、フラボノール類およびその誘導体には、HGFの産生を増強する活性があることが示された。

表 1

試料	濃度 (μ M)	HGF 産生量 (%)
試料①	0	100
	1	187
	10	543
	100	454
試料②	0	100
	10	139
	100	304

(ただし、対照のHGF産生量は、4.80 ng/mlであった。)

実施例2 エピガロカテキンガレートのHGF産生増強活性

実施例1と同様の方法で、エピガロカテキンガレートのHGF産生増強活性を測定した。ただし、エピガロカテキンガレートは、最終濃度が、0、1、10 μ Mになるように添加した。その結果を表2に示す。表2に示したように、エピガロカテキンガレートは、HGFの産生を増強した。

表 2

濃度 (μ M)	HGF 産生量 (%)
0	100
1	175
10	160

(ただし、対照のHGF産生量は、6.78 ng/mlであった。)

実施例3 ガリックスアシッドのHGF産生増強活性

実施例1と同様の方法で、ガリックスアシッドのHGF産生増強活性を測定した

。ただし、ガリックスドは、最終濃度が、0、1、10、100 μ Mになるように添加した。その結果を表3に示す。表3に示したように、ガリックスドは、HGFの産生を増強した。

表 3

濃度 (μ M)	HGF産生量 (%)
0	100
1	112
10	217
100	576

(ただし、対照のHGF産生量は、6.78 ng/mlであった。)

実施例4 クロロゲン酸のHGF産生増強活性

実施例1と同様の方法で、クロロゲン酸のHGF産生増強活性を測定した。クロロゲン酸（東京化成社製）は、最終濃度が、0、1、10、100、500、1000 μ Mになるように添加した。その結果を表4に示す。表4に示したように、クロロゲン酸は、HGFの産生を増強した。

表 4

濃度 (μ M)	HGF 産生量 (%)
0	100
1	105
10	122
100	302
500	479
1000	624

(ただし、対照のHGF産生量は、5.16 ng/mlであった。)

実施例5 コーヒー酸のHGF産生増強活性

実施例1と同様の方法で、コーヒー酸のHGF産生増強活性を測定した。ただし、コーヒー酸(シグマ社製)は、最終濃度が、0、10、100 μ Mになるように添加した。その結果を表5に示す。表5に示したように、コーヒー酸はHGFの産生を増強した。

表 5

濃度 (μ M)	HGF 産生量 (%)
0	100
10	117
100	196

(ただし、対照のHGF産生量は、6.27 ng/mlであった。)

実施例6 ジカフェオイルキナ酸の調製とHGF産生増強活性

(1) ヨモギ乾燥品(阪本漢方堂社製)40gを50%アセトン500mLで3回抽出した後、約15mLに減圧濃縮した。濃縮液に10%クエン酸水溶液を

35 mL 添加し、酢酸エチル 100 mL で 3 回抽出した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮した。濃縮物をクロロホルム：メタノール：酢酸＝2：1：1（体積比）を展開溶媒としたシリカクロマトグラフィーに供し、8 mL ずつ分取した。得られたフラクション 7～13 を集め、減圧濃縮した後、クロロホルム：メタノール：酢酸＝1：1：0.05 を展開溶媒としたシリカゲルプレート上で展開し、R_f 値 0.5 付近の UV 254 nm に吸収を示す物質 225 mg を回収した。この物質の構造を¹H-NMR で解析したところ、ジカフェオイルキナ酸（3,5-dicaffeoylquinic acid）であることが分かった。

（2）実施例 1 と同様の方法で、実施例 6－（1）で調製したジカフェオイルキナ酸の HGF 産生増強活性を測定した。ただし、ジカフェオイルキナ酸は、最終濃度が、0、1、10、100 μ M になるように添加した。その結果を表 6 に示す。表 6 に示したように、ジカフェオイルキナ酸は、HGF の産生を増強した。

表 6

濃度（ μ M）	HGF 産生量（％）
0	100
1	142
10	206
100	290

（ただし、対照の HGF 産生量は、6.27 ng/mL であった。）

実施例 7 ジカフェオイルキナ酸の調製と HGF 産生増強活性

春菊約 900 g の植物サンプルを凍結乾燥し、80% エタノール 2 L と共にミキサーにかけて磨砕し、ガーゼを用いてろ過を行ない、得られた抽出液を 200 mL に濃縮し、春菊粗抽出液を調製した。得られた粗抽出液 100 mL 分を XAD-2 樹脂（オル

ガノ社製) 200mL に供し、0%、30%、40%、60% および100%のメタノール、それぞれ500mL で溶出した。それぞれの画分を50mLにまで濃縮し、実施例 1 と同様に各画分のHGF 産生増強活性を確認したところ、表 7 に示すように60% メタノール溶出画分にHGF 産生増強活性が見られた。60% メタノール溶出画分を¹H-NMR で解析したところ、この画分には高濃度の3, 5- ジカフェオイルキナ酸が含有されていることが分かった。なお、当該画分は最終濃度が、0、0. 1、1 % になるように添加した。

表 7

春菊粗抽出液 60%メタノール画分 (%)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 1	2 2 0
1	3 4 9

(ただし、対照のHGF 産生量は、8. 22 ng/mlであった。)

実施例 8 イソオリエンチンのHGF 産生増強活性

細かくした竹葉約5 gを50% アセトン70mLと共に15分以上攪拌し、得られた抽出液を吸引ろ過し、残渣を再び同量の溶媒で抽出した。得られたろ液100mL のうち、1mL を減圧乾固した後、DMSO 1mLに溶解し、HGF 産生増強活性を実施例 1 と同様の方法で調べたところ、表 8 に示すようにHGF 産生増強活性が確認された。粗抽出液は最終濃度が、0、0. 1、1 %となるように添加した。粗抽出液を減圧濃縮し、濃縮液を水で20倍に希釈し、その一部を10mL分のXAD-2 (オルガノ社製) に供し、30%、40%、50%、60% および100%のメタノール、各30mLで溶出した。各画分のHGF 産生増強活性を実施例 1 と同様の方法で測定したところ、40% メタノール、30% メタノール画分に活性が確認された。30%、40% メタノール画分を濃縮・乾固し、クロロホルム：メタノール：酢酸=3 : 1 : 0.025 を展開

溶媒としたシリカカラムクロマトグラフィーに供し、10mLずつ分取した。¹H-NMR、FAB-MSにより分析した結果、フラクション19～35本目に、フラボンの一種のルテオリンの配糖体であるイソオリエンチン(isoorientin)を高濃度に含有する画分が得られ、この画分に表9に示す様なHGF産生増強活性が確認された。なお、当該フラクションは最終濃度が、0、0.1、1mg/mLになるように添加した。

¹H-NMR

isoorientin : σ 7.57(1H, dd, J=8.0, 2.0Hz), 7.55(1H, d, J=2.0Hz), 7.02(1H, d, J=8.0Hz), 6.81(1H, s), 6.63(1H, d, J=8.0Hz), 4.74(1H, d, J=10.0Hz), 4.19(1H, t, J=4.5Hz)

FAB-MASS

449(M+H)⁺

表 8

竹葉粗抽出液 (%)	HGF産生量 (%)
0	100
0.1	195
1	463

(ただし、対照のHGF産生量は、9.09ng/mLであった。)

表 9

イソオリエンチン高濃度画分 (mg/mL)	HGF産生量 (%)
0	100
0.1	131
1	318

(ただし、対照のHGF産生量は、9.62ng/mLであった。)

実施例 9 クロロゲン酸の異性体のHGF産生増強活性

乾燥プラム約300 gを100%メタノール 500mLと共にミキサーにかけて磨砕し、吸引ろ過によりろ液を得た。ろ液1mL を濃縮乾固し、1mL のDMSOに溶解した。このプラム粗抽出液のHGF産生増強活性を実施例1と同様の方法で調べたところ、表10に示すように活性が確認された。粗抽出液は最終濃度が、0、0.01、0.1、1%になるように添加した。

得られた粗抽出液を濃縮して抽出溶媒を除き水で1 Lに希釈し、200mL のXAD-2に供し、500mLの水で洗浄後、100%メタノールで吸着画分を溶出した。得られた溶出画分を濃縮後、少量の水に溶解した後、コスモシール140C₁₈-OPN(ナカライテスク社製)に供し、0%~25%のアセトニトリル/水、合計800mLのグラジエントで溶出し、約10mLずつ分取した。得られたフラクションを、¹H-NMRにより分析した結果、26本目~32本目のフラクションと41本目~48本目のフラクションにそれぞれ、クロロゲン酸の異性体であるネオクロロゲン酸(5-caffeoyl-quinic acid)、クリプトクロロゲン酸(4-caffeoyl-quinic acid)を高濃度に含む画分を得、それぞれ表11、表12に示すようにHGF産生増強活性が確認された。なお、それらの画分は最終濃度が、0、0.01、0.1mg/mLになるように添加した。

¹H-NMR

5-caffeoyl-quinic acid : σ 7.63(1H, d, J=15.5Hz), 7.19(1H, s), 7.12(1H, d, J=8.0Hz), 6.93(1H, d, J=8.0Hz), 5.40(1H, m), 4.18(1H, m), 3.77(1H, dd, J=9.5, 4.5Hz), 2.2 ~ 1.6(5H, m)

4-caffeoyl-quinic acid : σ 7.49(1H, d, J=15.5Hz), 7.04(1H, d, J=4.0Hz), 6.99(1H, dd, J=8.0, 4.0Hz), 6.73(1H, d, J=8.0Hz), 6.27(1H, d, 16Hz), 4.65(1H, dd, J=8.0, 3.0Hz), 4.08 (1H, m), 2.2~1.6(5H, m)

表 1 0

プラム粗抽出液 (%)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 0 1	1 1 1
0. 1	2 1 4
1	3 0 6

(ただし、対照のHGF産生量は、8. 0 2 n g / m lであった。)

表 1 1

ネオクロロゲン酸高濃度画分 (m g / m l)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 0 1	1 1 1
0. 1	3 2 1

(ただし、対照のHGF産生量は、9. 9 8 n g / m lであった。)

表 1 2

クリプトクロゲン酸高濃度画分 (m g / m l)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 0 1	1 0 3
0. 1	1 4 2

(ただし、対照のHGF産生量は、9. 9 8 n g / m lであった。)

実施例 1 0 注射剤の製造

注射剤

(1) 生理食塩水にミリセチン、ケルセチン、ケンフェロール、エピガロカテ

キングレート、ガリックアシッド、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD、コーヒー酸またはジカフェオイルキナ酸を1%濃度で加え、それぞれの注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水にミリセチン、ケルセチン、ケンフェロール、エピガロカテキンレート、ガリックアシッド、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD、コーヒー酸またはジカフェオイルキナ酸と、グリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

実施例11 錠剤の製造

錠剤

(1) ミリセチン、ケルセチン、ケンフェロール、エピガロカテキンレート、ガリックアシッド、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD、コーヒー酸またはジカフェオイルキナ酸100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、各錠剤を作製した。

(2) ミリセチン、ケルセチン、ケンフェロール、エピガロカテキンレート、ガリックアシッド、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD、コーヒー酸またはジカフェオイルキナ酸をそれぞれ0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

実施例12 鉄によるクロロゲン酸のHGF産生増強活性の増強

クロロゲン酸水溶液を100mMの濃度に調製した。次に、10mM 塩化第

二鉄（半井化学薬品社製）水溶液を調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で60分間静置した。この鉄処理したクロロゲン酸のHGF産生増強活性を実施例1と同様の方法で測定した。鉄処理したクロロゲン酸はクロロゲン酸に換算して0、10、100、500 μ Mとなるように添加した。なお、試料の添加は、予め種々の濃度の鉄処理したクロロゲン酸の水溶液を調製して培地に対し一定量添加し、前記最終濃度となるようにして行った。鉄処理したクロロゲン酸の最終濃度0 μ Mのものはクロロゲン酸非存在下に鉄処理して得られた水溶液を一定量添加したものである。また、比較として鉄処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。前記同様、蒸留水のみを一定量添加したもの（クロロゲン酸の最終濃度が0 μ M）を対照とし、当該細胞培養液中のHGF濃度を100%として相対値（%）によりHGF産生量を表した。その結果を表13に示す。鉄処理によりクロロゲン酸のHGF産生増強活性は増強された。

表 13

濃度（ μ M）		0	10	100	500
鉄処理なし	HGF産生量（%）	100	122	302	479
鉄処理	HGF産生量（%）	77	399	508	635

（ただし、対照のHGF産生量は5.16 ng/mlであった。）

実施例13 マンガンによるクロロゲン酸のHGF産生増強活性の増強

クロロゲン酸水溶液を100mMの濃度に調製した。次に、10mM 塩化マンガン（II）（ナカライテスク社製）水溶液を調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で60分間静置した。このマンガン処理したクロロゲン酸のHGF産生増強活性を実施例1と同様の方法で測定した。マンガン処理したクロロゲン酸は培地の1000分の1量（クロロゲン酸の最終濃度：50 μ M）となるように添加した。また、比較としてマンガン処理を行っていないクロロゲン酸に

についても同様に活性を測定した。その結果を表 1 4 に示す。マンガン処理によりクロロゲン酸の H G F 産生増強活性は増強された。

表 1 4

試料	H G F 産生量 (%)
クロロゲン酸 0 μ M	1 0 0
クロロゲン酸 50 μ M	1 4 8
マンガン処理したクロロゲン酸 50 μ M	3 6 4

(ただし、対照の H G F 産生量は 7.02 ng/ml であった。)

実施例 1 4 銅によるクロロゲン酸の H G F 産生増強活性の増強

クロロゲン酸水溶液を 1 0 0 mM の濃度に調製した。次に、1 0 mM 硫酸銅 (I I) (半井化学薬品社製) 水溶液を調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で 6 0 分間静置した。この銅処理したクロロゲン酸の H G F 産生増強活性を実施例 1 と同様の方法で測定した。銅処理したクロロゲン酸は培地の 1 0 0 0 分の 1 量 (クロロゲン酸の最終濃度: 5 0 μ M) となるように添加した。また、比較として銅処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表 1 5 に示す。銅処理によりクロロゲン酸の H G F 産生増強活性は増強された。

表 1 5

試料	H G F 産生量 (%)
クロロゲン酸 0 μ M	1 0 0
クロロゲン酸 50 μ M	1 4 8
銅処理したクロロゲン酸 50 μ M	2 9 3

(ただし、対照の H G F 産生量は 7.02 ng/ml であった。)

実施例 15 クロロゲン酸酸化処理物のHGF産生増強活性の増強

クロロゲン酸を100 mMの濃度になるように100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9)に溶解した。この溶液に12時間、ペリスターポンプを通じて空気を送り込むことでクロロゲン酸の酸化処理物を調製した。この酸化処理したクロロゲン酸のHGF産生増強活性を実施例1と同様の方法で測定した。酸化処理したクロロゲン酸はクロロゲン酸に換算して0、1、10、100、1000 μ Mとなるように添加した。なお、酸化処理したクロロゲン酸の最終濃度0 μ Mのものはクロロゲン酸非存在下に酸化処理して得られた水溶液を一定量添加したものである。また、比較として酸化処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表16に示す。酸化処理によりクロロゲン酸のHGF産生増強活性は増強された。

表 1 6

濃度 (μ M)		0	1	10	100	1000
酸化処理なし	HGF産生量 (%)	100	105	122	302	624
酸化処理	HGF産生量 (%)	100	198	541	704	687

(ただし、対照のHGF産生量は5.16 ng/mlであった。)

実施例 16 コーヒー酸酸化処理物のHGF産生増強活性の増強

コーヒー酸を100 mMの濃度になるように100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9)に溶解した。この溶液に12時間、ペリスターポンプを通じて空気を送り込むことでコーヒー酸の酸化処理物を調製した。この酸化処理したコーヒー酸のHGF産生増強活性を実施例1と同様の方法で測定した。酸化処理したコーヒー酸はコーヒー酸に換算して0、1、10、100、1000 μ Mとなるように添加した。また、比較として酸化処理を行っていないコーヒー酸についても

同様に活性を測定した。その結果を表 17 に示す。酸化処理によりコーヒー酸の HGF 産生増強活性は増強された。

表 17

濃度 (μ M)		0	1	10	100	1000
酸化処理なし	HGF 産生量 (%)	100	85	117	196	92
酸化処理	HGF 産生量 (%)	100	307	353	411	555

(ただし、対照の HGF 産生量は 6.27 ng/ml であった。)

実施例 17 鉄によるクロロゲン酸の NGF 産生増強活性の増強 (1)

クロロゲン酸 (東京化成社製) 水溶液を 100 mM の濃度に調製した。次に、10 mM 塩化第二鉄 (半井化学薬品社製) 水溶液を調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で 60 分間静置し、鉄処理クロロゲン酸を調製した。この鉄処理クロロゲン酸の NGF 産生に及ぼす影響を以下の方法で測定した。

マウス線維芽細胞 L-M 細胞 (ATCC CCL-1.2) を 0.5% のバクトペプトン (ギブコ社製) を含む M199 培地 (ICN 社製) で 1.5×10^5 細胞/ml に懸濁し 96 穴プレートに 0.1 ml ずつまき無菌的に培養した。3 日間培養後、培地を取り除き、0.5% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含む M199 培地に置き換えた。これに、上記鉄処理したクロロゲン酸を培地の 100 分の 1 量 (クロロゲン酸の最終濃度: 500 μ M) となるように添加し、20 時間培養した。培養終了後、培養液中の NGF の濃度をエンザイムイムノアッセイ法 (NGF Emax Immuno Assay System: プロメガ社製) にて測定した。なお、鉄処理したクロロゲン酸の最終濃度 0 μ M のものはクロロゲン酸非存在下に鉄処理して得られた水溶液を一定量添加したものである。また、比較として鉄処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。前記同様、蒸留水のみを一定量添加したものの (鉄処理を行っていないクロロゲン酸の最終濃度が 0 μ M) を対照とし、当該

細胞培養液中のNGF濃度を100%として相対値(%)によりNGF産生量を表した。その結果を表18に示す。実験は2連で行い、その平均値を採用した。鉄処理によりクロロゲン酸のNGF産生増強活性は増強された。

表18

濃度 (μ M)		0	500
鉄処理なし	NGF産生量 (%)	100	351.1
鉄処理	NGF産生量 (%)	98.8	476.7

(ただし、対照のNGF産生量は0.174ng/mlであった。)

実施例18 鉄によるクロロゲン酸のNGF産生増強活性の増強(2)

クロロゲン酸水溶液を100mMの濃度に調製した。次に、5、10、20mM塩化第二鉄水溶液を各々調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で60分間静置した。この鉄処理したクロロゲン酸のNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。鉄処理したクロロゲン酸は培地の100分の1量(クロロゲン酸の最終濃度:500 μ M)となるように添加した。また、比較として鉄処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表19に示す。鉄は濃度依存的にクロロゲン酸のNGF産生増強活性を増強した。

表19

濃度 (μ M)	0	500	500	500	500
鉄濃度 (μ M)	0	0	25	50	100
NGF産生量 (%)	100	351.1	355.0	441.6	472.6

(ただし、対照のNGF産生量は0.176ng/mlであった。)

実施例 19 マンガンによるクロロゲン酸のNGF産生増強活性の増強 (1)

クロロゲン酸水溶液を25、50、100mMの濃度に調製した。次に、10mM 塩化マンガン (II) (ナカライテスク社製) 水溶液を調製し等容量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で60分間静置した。このマンガン処理したクロロゲン酸のNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。マンガン処理したクロロゲン酸は培地の100分の1量 (クロロゲン酸の最終濃度: 125、250、500 μ M) となるように添加した。また、比較としてマンガン処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表20に示す。マンガン処理によりクロロゲン酸のNGF産生増強活性は増強された。

表 20

濃度 (μ M)		0	125	250	500
マンガン処理なし	NGF産生量 (%)	100	124.6	308.5	382.2
マンガン処理	NGF産生量 (%)	94.0	495.3	691.0	877.4

(ただし、対照のNGF産生量は0.145ng/mlであった。)

実施例 20 マンガンによるクロロゲン酸のNGF産生増強活性の増強 (2)

クロロゲン酸水溶液を100mMの濃度に調製した。次に、2.5、5、10mM 塩化マンガン (II) 水溶液を調製し等量のクロロゲン酸水溶液と混合し、室温で60分間静置した。このマンガン処理したクロロゲン酸のNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。マンガン処理したクロロゲン酸は培地の100分の1量 (クロロゲン酸の最終濃度: 500 μ M) となるように添加した。また、比較としてマンガン処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表21に示す。マンガンは濃度依存的にクロロゲン酸のNGF産生増強活性を増強した。

表 2 1

濃度 (μ M)	0	500	500	500	500
マンガン濃度 (μ M)	0	0	12.5	25	50
NGF 産生量 (%)	100	328.5	567.5	647.6	661.6

(ただし、対照のNGF産生量は0.186ng/mlであった。)

実施例 2 1 マンガンによるコーヒー酸のNGF産生増強活性の増強

コーヒー酸 (シグマ社製) 水溶液を 12.5、25、50 mM の濃度に調製した。次に、10 mM 塩化マンガン (II) 水溶液を調製し等容量のコーヒー酸水溶液と混合し、室温で 60 分間静置した。このマンガン処理したコーヒー酸のNGF産生増強活性を実施例 1 7 と同様の方法で測定した。マンガン処理したコーヒー酸は培地の 100 分の 1 量 (コーヒー酸の最終濃度: 62.5、125、250 μ M) となるように添加した。また、比較としてマンガン処理を行っていないコーヒー酸についても同様に活性を測定した。その結果を表 2 2 に示す。マンガン処理によりコーヒー酸のNGF産生増強活性は増強された。

表 2 2

濃度 (μ M)	0	62.5	125	250
マンガン処理なし NGF 産生量 (%)	100	97.8	199.5	221.2
マンガン処理 NGF 産生量 (%)	96.4	188.2	235.2	267.4

(ただし、対照のNGF産生量は0.253ng/mlであった。)

実施例 2 2 クロロゲン酸酸化処理物のNGF産生増強活性の増強

クロロゲン酸を 100 mM の濃度になるように 100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9) に溶解した。この溶液に 12 時間、ペリスターポンプを通じて空気を送り込むことでクロロゲン酸の酸化処理物を調製した。この酸化処理したク

クロロゲン酸のNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。酸化処理したクロロゲン酸はクロロゲン酸に換算して0、250、500、1000 μ Mとなるように添加した。なお、酸化処理したクロロゲン酸の最終濃度0 μ Mのものはクロロゲン酸非存在下に酸化処理して得られた水溶液を一定量添加したものである。また、比較として酸化処理を行っていないクロロゲン酸についても同様に活性を測定した。その結果を表23に示す。酸化処理によりクロロゲン酸のNGF産生増強活性は増強された。

表 2 3

濃度 (μ M)		0	250	500	1000
酸化処理なし	NGF産生量 (%)	100	192.8	231.9	256.2
酸化処理	NGF産生量 (%)	100	211.0	368.7	642.7

(ただし、対照のNGF産生量は0.166ng/mlであった。)

実施例 2 3 コーヒー酸酸化処理物のNGF産生増強活性の増強

コーヒー酸を100 mMの濃度になるように100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9) に溶解した。この溶液に12時間、ペリスターポンプを通じて空気を送り込むことでコーヒー酸の酸化処理物を調製した。この酸化処理したコーヒー酸のNGF産生増強活性を実施例22と同様の方法で測定した。酸化処理したコーヒー酸はコーヒー酸に換算して0、250、500、1000 μ Mとなるように添加した。また、比較として酸化処理を行っていないコーヒー酸についても同様に活性を測定した。その結果を表24に示す。酸化処理によりコーヒー酸のNGF産生増強活性は増強された。

表 2 4

濃度 (μ M)		0	250	500	1000
酸化処理なし	NGF 産生量 (%)	100	227.8	287.9	269.3
酸化処理	NGF 産生量 (%)	100	275.3	449.5	655.2

(ただし、対照のNGF産生量は0.218ng/mlであった。)

実施例 2 4 コーヒー酸エステルの合成とNGF産生増強活性

(1) コーヒー酸メチルエステルの合成

0.1 g のコーヒー酸を10% 硫酸を含むメタノールに溶解し、無水硫酸ナトリウム存在下で、100 °C、1 時間加熱した。反応液から無水硫酸ナトリウムをろ過により取り除き、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。つぎに、反応物を逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (径21.5 mm ×長30 cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水とアセトニトリルを容量比2対3で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1対4で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) の溶出比は0 分から30分にかけて溶媒B比を直線的に25%から45%に、続く15分間は溶媒B比を45%に保持とした。溶出速度は5 ml / 分、検出は215nm で行った。保持時間19.8分のピークを含むフラクションを採取し濃縮乾固することにより3.7 mgの化合物を得た。得られた化合物をNMRにより解析し、化合物がコーヒー酸メチルエステルであることを確認した。

NMRスペクトル、質量スペクトルの測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$: δ 3.67(3H, s, OCH₃), 6.26(1H, d, J=16.0 Hz, 2'-H), 6.74(1H, d, J=8.0 Hz, 5-H), 6.99(1H, dd, J=2.0, 8.0 Hz, 6-H), 7.04(1H, d, J=2.0 Hz, 2-H), 7.47(1H, d, J=16.0 Hz, 3'-H), 9.16(1H, s, 3-OH), 9.63(1H, s, 4-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの

化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

FAB-MS : m/z 195(M+H)⁺ (但し、グリセロールをマトリックスに用いた。)

(2) コーヒー酸エチルエステルの合成

0.1 g のコーヒー酸を10% 硫酸を含むエタノールに溶解し、実施例 2 4 - (1) と同様に加熱反応、精製操作を行い、逆相クロマトグラフィー上で、保持時間 23.8 分のピークを含むフラクションを採取し濃縮乾固することにより2.7 mgの化合物を得た。得られた化合物をNMRにより解析し、化合物がコーヒー酸エチルエステルであることを確認した。

NMRスペクトル、質量スペクトルの測定結果を以下に示す。

¹ H-NMR : δ 1.22(3H, t, J=7.0 Hz, 2'-H), 4.14(2H, q, J=7.0 Hz, 1'-H), 6.24(1H, d, J=16.0 Hz, 2'-H), 6.74(1H, d, J=8.0 Hz, 5-H), 6.99(1H, dd, J=2.0, 8.0 Hz, 6-H), 7.03(1H, d, J=2.0 Hz, 2-H), 7.45(1H, d, J=16.0 Hz, 3'-H), 9.15(1H, s, 3-OH), 9.62(1H, s, 4-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

FAB-MS : m/z 209(M+H)⁺ (但し、グリセロールをマトリックスに用いた。)

(3) コーヒー酸メチルエステルおよびコーヒー酸エチルエステルのNGF産生増強活性

実施例 2 4 - (1) と (2) で合成したコーヒー酸メチルエステルおよびコーヒー酸エチルエステルのNGF産生増強活性を実施例 1 7 と同様の方法で測定した。

コーヒー酸メチルエステルは最終濃度が0、0.0625、0.125 mg/mlになるように、一方、コーヒー酸エチルエステルは最終濃度が0、0.0625 mg/mlになるように添加した。結果を表 2 5 に示す。コーヒー酸メチル

エステルおよびコーヒー酸エチルエステルはL-M細胞のNGF産生を増強した。
。

表 2 5

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
コーヒー酸メチルエステル	0	100
	0.0625	824.4
	0.125	889.6
コーヒー酸エチルエステル	0	100
	0.0625	1279.1

(ただし、対照のNGF産生量は、0.109 ng/mlであった。)

実施例 2 5 コーヒー酸メチルエステルのNGF産生増強活性

(1) アシタバ根部からの水抽出低分子画分XAD-2 処理物の調製

乾燥アシタバ (*Angelica keiskei* koidz.) 根部粉末5.8 kgに24Lの酢酸エチルを加え室温で3時間、抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に18Lのエタノールを加え室温で一晩抽出をおこなった。つぎに、吸引ろ過後の残渣に52Lの蒸留水を加え60℃で3時間抽出をおこなった。固形残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮したものに2.5倍量のエタノールを加え、4℃で一晩静置した。その後、吸引ろ過で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分を、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固しアシタバ根部水抽出低分子画分を得た。つぎにアシタバ根部水抽出低分子画分をアンバーライトXAD-2 (オレガノ社製: 樹脂量2 L) に供し、蒸留水30Lで非吸着物を十分に洗いだし、次に、16Lのメタノールで吸着物を溶出した。メタノール溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、アシタバ根部水抽出低分子XAD-2 画分処理物を得た。

(2) アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物によるNGF産生の増強

実施例 25 - (1) で調製したアシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物の NGF 産生増強活性を実施例 17 と同様の方法で測定した。アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物は0、0.85、1.7、3.4 mg/ml となるように添加した。アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物は、表 26 に示すように濃度依存的に L-M細胞の NGF 産生を増強した。

表 26

アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	100
0.85	655.3
1.7	858.8
3.4	1127.6

(ただし、対照の NGF 産生量は、0.074 ng/ml であった。)

(3) アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物のコスモシール 140 クロマトグラフィーによる分画

実施例 25 - (1) で調製したアシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製：樹脂量400 ml) を用いた。アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物を供し、展開溶媒としてそれぞれ1 Lの蒸留水、20%アセトニトリル水溶液、25%アセトニトリル水溶液、40%アセトニトリル水溶液、メタノールの順に溶出を行い、各溶出画分を減圧濃縮した。

(4) アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物のコスモシール 140 クロマトグラフィー分画物による NGF 産生の増強

実施例 25 - (3) で調製したコスモシール 140 クロマトグラフィー分画物の NGF 産生増強活性を実施例 17 と同様の方法で測定した。その結果、20% アセトニトリル水溶液溶出画分、25% アセトニトリル水溶液溶出画分、40% アセトニトリル水溶液溶出画分に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 27 にその結果を示す。

表 27

画分	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
20% アセトニトリル水溶液溶出画分	4.05	301.0
	8.1	436.7
	16.2	1263.3
25% アセトニトリル水溶液溶出画分	0.7	161.7
	1.5	1028.8
	2.8	2110.4
40% アセトニトリル水溶液溶出画分	0.575	465.3
	1.15	653.1
	2.3	1226.2

(ただし、対照の NGF 産生量は、20% アセトニトリル 溶出画分は 0.074ng/ml、25% 及び 40% アセトニトリル 溶出画分は 0.087ng/ml であった。)

(5) コスモシール 140 の 25% アセトニトリル水溶液溶出画分の ODS-80 Ts クロマトグラフィーによる分画

実施例 25 - (3) で調製したコスモシール 140 の 25% アセトニトリル水溶液溶出画分の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。カラムは TSK gel ODS-80Ts (径 21.5mm × 長 30cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒 A (蒸留水) と溶媒 B (蒸留水とアセトニトリルを容量比 1 対

1で混合したもの)の溶出比は0分から120分にかけて溶媒B比を直線的に25%から100%に、続く20分間は溶媒B比を100%に保持、最後に溶媒B比を25%にし20分間保持とした。溶出速度は5ml/分、検出は235nmで行った。紫外線吸収を指標にフラクションを採取した。

(6) コスモシール140の25% アセトニトリル水溶液溶出画分のODS-80Tsクロマトグラフィー分画物によるNGF産生の増強

実施例25-(5)で得られたコスモシール25% アセトニトリル水溶液溶出画分のODS-80Tsクロマトグラフィー分画物の活性を実施例17と同様の方法で測定した。その結果、多くのフラクションに、NGF産生増強活性があることが明らかになった。表28にその結果を示す。

表 2 8

分画フラクション (検出ピーク : 分)	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
1 (46.0, 47.2, 49.0)	2.00	250.8
2 (53.2)	2.00	275.2
3 (54.0)	2.00	318.7
4 (54.9, 55.5, 56.4)	2.00	293.0
5 (57.6)	2.00	320.5
6 (58.6)	2.00	297.8
7 (59.3)	2.00	324.8
8 (60.5)	2.00	324.8
9 (61.3)	2.00	402.8
10 (62.2)	2.00	565.5
11 (63.0)	2.00	616.9
12 (64.1)	2.00	575.4
13 (66.9)	2.00	805.3
14 (68.4)	2.00	819.6
15 (69.2)	2.00	510.2
16 (70.3)	1.00	389.2
17 (71.3, 71.9)	1.00	609.1
18 (73.0, 73.8, 74.9)	0.50	1002.5
19 (75.4)	0.50	851.3
20 (76.5)	1.00	838.5
21 (77.7)	1.00	249.4
22 (79.6, 80.5)	0.50	234.3
23 (82.4)	0.25	359.1
24 (84.1)	0.25	285.8
25 (85.5)	0.0625	359.1
26 (86.9, 87.5)	0.10	411.6
27 (89.1)	0.50	443.3
28 (91.4)	0.05	1058.1
29 (92.8)	0.20	672.0
30 (93.8, 95.8, 97.5, 100.0, 100.6)	0.50	593.6

(ただし、対照のNGF産生量は、フラクション1～9は0.355ng/ml、フラクション10～18は0.382ng/ml、フラクション19～27は0.415ng/ml、フラクション28～30は0.450 ng/mlであった。)

(7) フラクション18の逆相クロマトグラフィーによる分画

実施例25-(6)で強い活性が確認されたフラクション18(保持時間73.0、73.8、74.9分の検出のピークを含むフラクション)を逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分画した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80TsQA(径4.6mm×長25cm:東ソー社製)を用いた。溶媒A(0.1%トリフルオロ酢酸を含む蒸留水)と溶媒B(蒸留水とアセトニトリルを容量比1対1で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む)の溶出比は20分間、溶媒B比を50%保持とした。溶出速度は1 ml/分、検出は235nmで行い、紫外線吸収を指標にフラクションを採取した。

(8) フラクション18のODS-80TsQAクロマトグラフィー分画物によるNGF産生の増強

実施例25-(7)においてTSK gel ODS-80TsQAクロマトグラフィーで分画されたフラクションの活性を実施例17と同様の方法で測定した。その結果、9.3、10.1、10.6、10.9、11.2、12.0、12.8、13.3、14.0、15.2、16.1、18.6分の検出のピークを含むフラクションに、NGF産生増強活性があることが明らかになった。表29にその結果を示す。

表 2 9

分画フラクション (検出ピーク : 分)	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
18-1 (9.3)	0.20	1489.6
18-2 (10.1)	0.50	2222.9
18-3 (10.6)	0.25	3039.6
18-4 (10.9)	0.0375	2510.4
18-5 (11.2)	0.125	610.4
18-6 (12.0)	0.50	560.4
18-7 (12.8)	0.50	681.3
18-8 (13.3)	0.40	339.6
18-9 (14.0)	1.00	410.4
18-10 (15.2)	1.00	2510.7
18-11 (16.1)	1.00	3360.7
18-12 (18.6)	1.00	1189.3

(ただし、対照のNGF産生量は、18-1～9 は0.027ng/ml、18-10～12は0.015ng/mlであった。)

実施例 25-(7) で調製し、実施例 25-(8) で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション 18-3 の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302 : 日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 m/z 195(M+H)⁺ のピークを検出した。第 1 図に、アシタバ根部由来フラクション 18-3 の MS スペクトルを示す。第 1 図において、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度を示す。

(9) フラクション 18-3 の ¹H-NMR 解析

実施例 25-(7) で調製し、実施例 25-(8) で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション 18-3 を核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500 :

日本電子社製)を用い各種NMRスペクトルを測定し構造解析した。以下にNMRの帰属の信号を示した。

$^1\text{H-NMR}$: δ 3.68(3H, s, OCH_3), 6.25(1H, d, $J=16.0$ Hz, $2'\text{-H}$), 6.75(1H, d, $J=8.0$ Hz, 5-H), 6.98(1H, dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, 6-H), 7.03(1H, d, $J=2.0$, 2-H), 7.46(1H, d, $J=16.0$ Hz, $3'\text{-H}$), 9.10(1H, s, 3-OH), 9.56(1H, s, 4-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第2図に、アシタバ根部由来フラクション18-3の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第2図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(10) フラクション18-3の構造の確定

実施例25-(7)で調製し、実施例25-(8)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション18-3について行った質量スペクトル解析、NMRスペクトル解析の結果、活性成分がコーヒー酸メチルエステル(分子量194)であることを確認した。

実施例26 コーヒー酸エチルエステルのNGF産生増強活性

(1) フラクション28のMS解析

実施例25-(5)で調製し、実施例25-(6)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション28(保持時間91.4分の検出のピークを含むフラクション)の質量(MS)スペクトルを質量分析計(DX302:日本電子社製)によりFAB-MSの手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 m/z 209($\text{M}+\text{H}$) $^+$ のピークを検出した。第3図に、アシタバ根部由来フラクション28のMSスペクトルを示す。第3図において、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度を示す。

(2) フラクション28の¹H-NMR 解析

実施例25-(5)で調製し、実施例25-(6)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション28を核磁気共鳴(NMR)スペクトル装置(JNM-A500 : 日本電子社製)を用い各種NMRスペクトルを測定し構造解析した。以下にNMRの帰属の信号を示した。

¹H-NMR : δ 1.23(3H, t, J=7.0 Hz, 2''-H), 4.14(2H, q, J=7.0 Hz, 1''-H), 6.24(1H, d, J=16.0 Hz, 2'-H), 6.74(1H, d, J=8.0 Hz, 5-H), 6.98(1H, dd, J=2.0, 8.0 Hz, 6-H), 7.03(1H, d, J=2.0 Hz, 2-H), 7.45(1H, d, J=16.0 Hz, 3'-H), 9.11(1H, s, 3-OH), 9.57(1H, s, 4-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第4図に、アシタバ根部由来フラクション28の¹H-NMRスペクトルを示す。第4図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(3) フラクション28の構造の確定

実施例25-(5)で調製し、実施例25-(6)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション28について行った質量スペクトル解析、NMRスペクトル解析の結果、活性成分がコーヒー酸エチルエステル(分子量208)であることを確認した。

実施例27 イソキサントフモールのNGF産生増強活性

(1) ホップ由来キサントフモールフラクション(ホップシュタイナー社製) 0.4gをクロロホルム3 mlで溶解しシリカクロマトに供した。クロロホルム(1000 ml)、クロロホルム:メタノール=50:1(1000 ml)、クロロホルム:メタノール=20:1(1000 ml)の順に段階的に溶出し、1フラクションに8 mlずつ分

取した。得られたフラクション67～100 を減圧濃縮し、ホップ由来キサントフモールフラクションー画分Aを得た。さらに逆相クロマトグラフィーを用いてホップ由来キサントフモールフラクションー画分Aを精製した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (径21.5 mm ×長30 cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水とアセトニトリルを容量比3対2で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1対4で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) の溶出比は0分から60分にかけて溶媒B比を直線的に50%から100%に、続く20分間は溶媒B比を100%に保持、最後に溶媒B比を50%にし20分間保持とした。溶出速度は5 ml/分、検出は370 nmで行い、1分間ごとにフラクションを採取した。保持時間42.5分の検出のピークを含むフラクションを濃縮乾固することにより、高純度のキサントフモール (Xanthohumol) (19.4 mg) を調製した。

(2) 実施例27-(1) で調製したキサントフモール3.5 mgをジメチルスルホキシド溶液0.75 mlに溶解したものを、200 mlの10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5、10%のサッカロースを含む) に添加し、100℃で2時間加熱した。冷却後、反応液を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製: 樹脂量20 ml) を用いた。反応液をカラムに供し、展開溶媒としてそれぞれ50 ml の蒸留水、20%、30%、40%、50%、60%、70% アセトニトリル水溶液、メタノールの順に溶出を行った。その結果、40% アセトニトリル水溶液溶出画分を濃縮乾固することにより、高純度のイソキサントフモール (Isoxanthohumol) (2.1 mg) を得た。得られた化合物を核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500 : 日本電子社製) を用い各種NMRスペクトルを測定し解析することにより構造を確認した。

NMRスペクトル、質量スペクトルの測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.52(3H, s, $3''\text{-CH}_3$), 1.57(3H, s, $3''\text{-CH}_3$), 2.54(1H, dd, $J=3.0, 16.5$ Hz, 3-H), 2.92(1H, dd, $J=12.5, 16.5$ Hz, 3-H), 3.09(2H, d, $J=7.0$ Hz, $1''\text{-H}$), 3.68(3H, s, 5-OCH_3), 5.07(1H, t, $J=7.0$ Hz, $2''\text{-H}$), 5.30(1H, dd, $J=3.0, 12.3$ Hz, 2-H), 6.12(1H, s, 6-H), 6.76(2H, d, $J=8.5$ Hz, $3'\text{-H}$ および $5'\text{-H}$), 7.27(2H, d, $J=8.5$ Hz, $2'\text{-H}$ および $6'\text{-H}$), 9.53(1H, s, $4'\text{-OH}$), 10.43(1H, brs, 7-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

FAB-MS : m/z 355 ($M+H$) $^+$ (但し、グリセロールをマトリックスに用いた。)

(3) 実施例27-(2)で調製したイソキサントフモールのNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。その結果を表30に示す。イソキサントフモールは、0、50、100、200 μM となるように添加した。イソキサントフモールは、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 30

濃度 (μM)	NGF産生量 (%)
0	100
50	110.7
100	121.4
200	198.0

(ただし、対照のNGF産生量は、0.181 ng/mlであった。)

実施例28

(1) キサントフモールフラクション(ホップシュタイナー社製) 0.4gをクロロホルム3 mlに溶解しシリカクロマトに供した。クロロホルム(1000 ml)、クロ

ロホルム：メタノール＝50：1（1000 ml）、クロロホルム：メタノール＝20：1（1000 ml）の順に段階的に溶出し、1フラクションに8 mlずつ分取した。得られたフラクション67～100を減圧濃縮し、ホップ由来キサントフモールフラクションー画分Aを得た。

（2）上記キサントフモールフラクションー画分Aをさらに逆相クロマトグラフィーを用いて精製単離した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel OD S-80Ts（径21.5 mm X 長30 cm：東ソー社製）を用いた。溶媒A（蒸留水とアセトニトリルを容量比3対2で混合したもので0.1% トリフルオロ酢酸を含む）と溶媒B（蒸留水とアセトニトリルを容量比1対4で混合したもので0.1% トリフルオロ酢酸を含む）の溶出比は0分から60分にかけて溶媒B比を直線的に50%から100%に、続く20分間は溶媒B比を100%に保持、最後に溶媒B比を50%にし20分間保持とした。溶出速度は5 ml/分、検出は370 nmで行い、1分間ごとにフラクションを採取した。

（3）上記キサントフモールフラクションー画分Aの逆相クロマトフラクションのNGF産生増強活性を実施例17と同様の方法で測定した。その結果、21.1、22.2、24.2、25.7、28.6分の検出のピークを含むフラクションにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表31にその結果を示す。

表 3 1

フラクション (保持時間 : 分)	濃度 (mg / ml)	NGF 産生量 (%)
A-1 (21.1)	0.025	92.4
	0.05	151.4
A-2 (22.2)	0.05	109.5
	0.1	136.2
	0.2	208.6
A-3 (24.2)	0.0125	134.3
	0.025	151.4
	0.05	202.9
	0.1	298.1
A-4 (25.7)	0.025	197.1
	0.05	345.7
	0.1	416.2
A-5 (28.6)	0.0125	145.7
	0.025	189.5
	0.05	229.5
	0.1	517.1

(ただし、対照のNGF産生量は、0.093 ng/ml であった。)

(4) 上記フラクションA-5 (保持時間28.6分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302 : 日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 m/z 371(M+H)⁺ のピークを検出した。第5図に、キサントフモールフラクション由来のフラクションA-5のMSスペクトルを示す。第5図において、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度を示す。

さらに、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500 : 日本電子社製) を用い各種NMRスペクトルを測定し構造解析した結果、活性成分がキサントフモールB (分子量370) とキサントフモールD (分子量370) の混合物 (混合比 1 : 1.65) であることを確認した。以下にNMRの帰属の信号を示す。

キサントフモールB

¹H-NMR : δ 1.21(3H, s, 6-H), 1.27(3H, s, 6-H), 2.70(2H, m, 4-H), 3.65((1H, m, 5-H), 3.87(3H, s, 6-OCH₃), 6.00(1H, s, 5-H), 6.80(2H, m, 3-Hおよび5-H), 7.55(2H, m, 2-H および6-H), 7.70(1H, m, β -H), 7.75(1H, m, α

-H), 10.12(1H, s, 4-OH), 14.18(1H, s, 2-OH)

キサントフモールD

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.71(3H, s, 5-H), 2.60(2H, m, 1-H), 3.85(3H, s, 6-OCH₃), 4.20(1H, m, 2-H), 4.58(1H, s, 4-H), 4.61(1H, s, 4-H), 6.04(1H, s, 5-H), 6.80(2H, m, 3-Hおよび5-H), 7.55(2H, m, 2-H および6-H), 7.70(1H, m, β -H), 7.75(1H, m, α -H), 10.09(1H, s, 4-OH), 10.58(1H, s, 4-OH), 14.69(1H, s, 2-OH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第6図に、キサントフモールフラクション由来のフラクションA-5の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第6図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ポリフェノール類、その誘導体及び／又はその塩、またはポリフェノール類、その誘導体及び／又はその塩の(i)金属、金属塩及び／又は金属イオンとの混合処理もしくは(ii)酸化処理により得られる組成物を有効成分とする、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防のための治療剤、予防剤、食品、飲料および飼料が提供される。前記有効成分は、特に肝細胞増殖因子および神経成長因子の産生増強作用に優れており、従って、本発明の好ましい態様によれば、特に肝細胞増殖因子および神経成長因子の産生増強を必要とする疾患の治療または予防のための治療剤、予防剤、食品、飲料および飼料が提供される。

請求の範囲

1. (i) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種、あるいは

(ii) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも1種との混合処理、または

(B) 酸化処理

により得られる組成物、

を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤。

2. ポリフェノール類がフラボノイド類、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、コーヒー酸およびジカフェオイルキナ酸からなる群より選択される少なくとも1種である請求項1記載の治療剤または予防剤。

3. フラボノイド類がフラボノール類、フラバノン、カルコンおよびフラバノールからなる群より選択される少なくとも1種である請求項2記載の治療剤または予防剤。

4. フラボノール類がミリセチンおよび／またはケルセチンであり、フラバノンがイソキサントフモールであり、カルコンがキサントフモールBおよび／またはキサントフモールDであり、フラバノールがエピガロカテキンガレートである請求項3記載の治療剤または予防剤。

5. ポリフェノール類の誘導体がポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である請求項 1～4 いずれか記載の治療剤または予防剤。

6. ポリフェノール類のカルボン酸エステルがコーヒー酸メチルエステルおよび／またはコーヒー酸エチルエステルであり、ポリフェノール類の配糖体がイソオリエンチンである請求項 5 記載の治療剤または予防剤。

7. 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも 1 種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオンである請求項 1～6 いずれか記載の治療剤または予防剤。

8. 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である請求項 1～7 いずれか記載の治療剤または予防剤。

9. (i) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも 1 種、あるいは

(ii) ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも 1 種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも 1 種との混合処理、または

(B) 酸化処理

により得られる組成物、

を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強用の食品、飲料または飼料。

10. ポリフェノール類がフラボノイド類、ガリックアシッド、クロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、コーヒー酸およびジカフェオイルキナ酸からなる群より選択される少なくとも1種である請求項9記載の食品、飲料または飼料。

11. フラボノイド類がフラボノール類、フラバノン、カルコンおよびフラバノールからなる群より選択される少なくとも1種である請求項10記載の食品、飲料または飼料。

12. フラボノール類がミリセチンおよび／またはケルセチンであり、フラバノンがイソキサントフモールであり、カルコンがキサントフモールBおよび／またはキサントフモールDであり、フラバノールがエピガロカテキンガレートである請求項11記載の食品、飲料または飼料。

13. ポリフェノール類の誘導体がポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である請求項9～12いずれか記載の食品、飲料または飼料。

14. ポリフェノール類のカルボン酸エステルがコーヒー酸メチルエステルおよび／またはコーヒー酸エチルエステルであり、ポリフェノール類の配糖体がイソオリエンチンである請求項13記載の食品、飲料または飼料。

15. 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも1種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオン

である請求項 9 ～ 1 4 いずれか記載の食品、飲料または飼料。

1 6. 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である請求項 9 ～ 1 5 いずれか記載の食品、飲料または飼料。

1 7. ポリフェノール類、その誘導体およびそれらの塩からなる群より選択される少なくとも 1 種の、

(A) 金属、金属塩および金属イオンからなる群より選択される少なくとも 1 種との混合処理、または

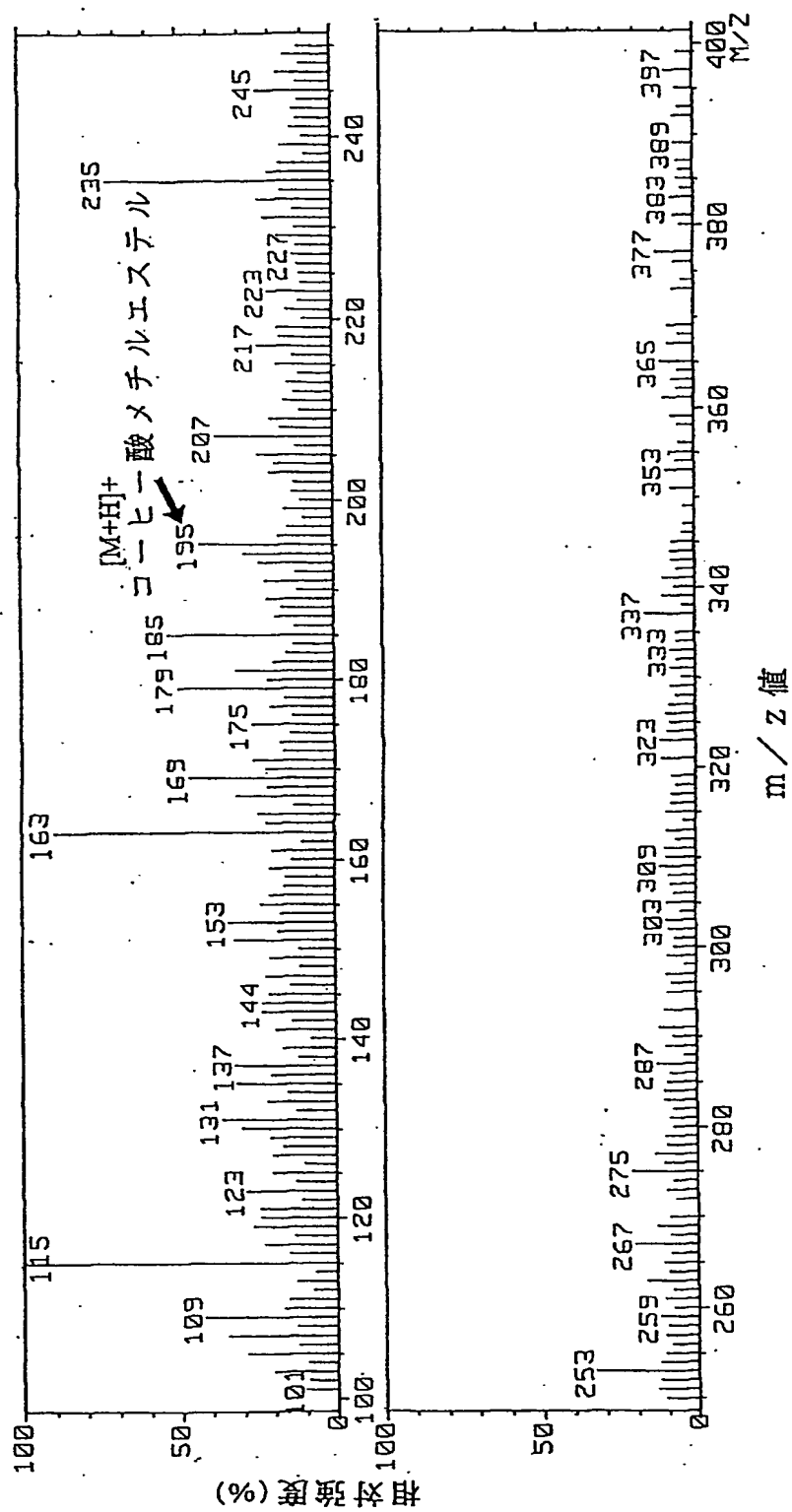
(B) 酸化処理
により得られる組成物。

1 8. ポリフェノール類がクロロゲン酸および／またはコーヒー酸であり、誘導体が前記ポリフェノール類のカルボン酸エステルおよび／または配糖体である請求項 1 7 記載の組成物。

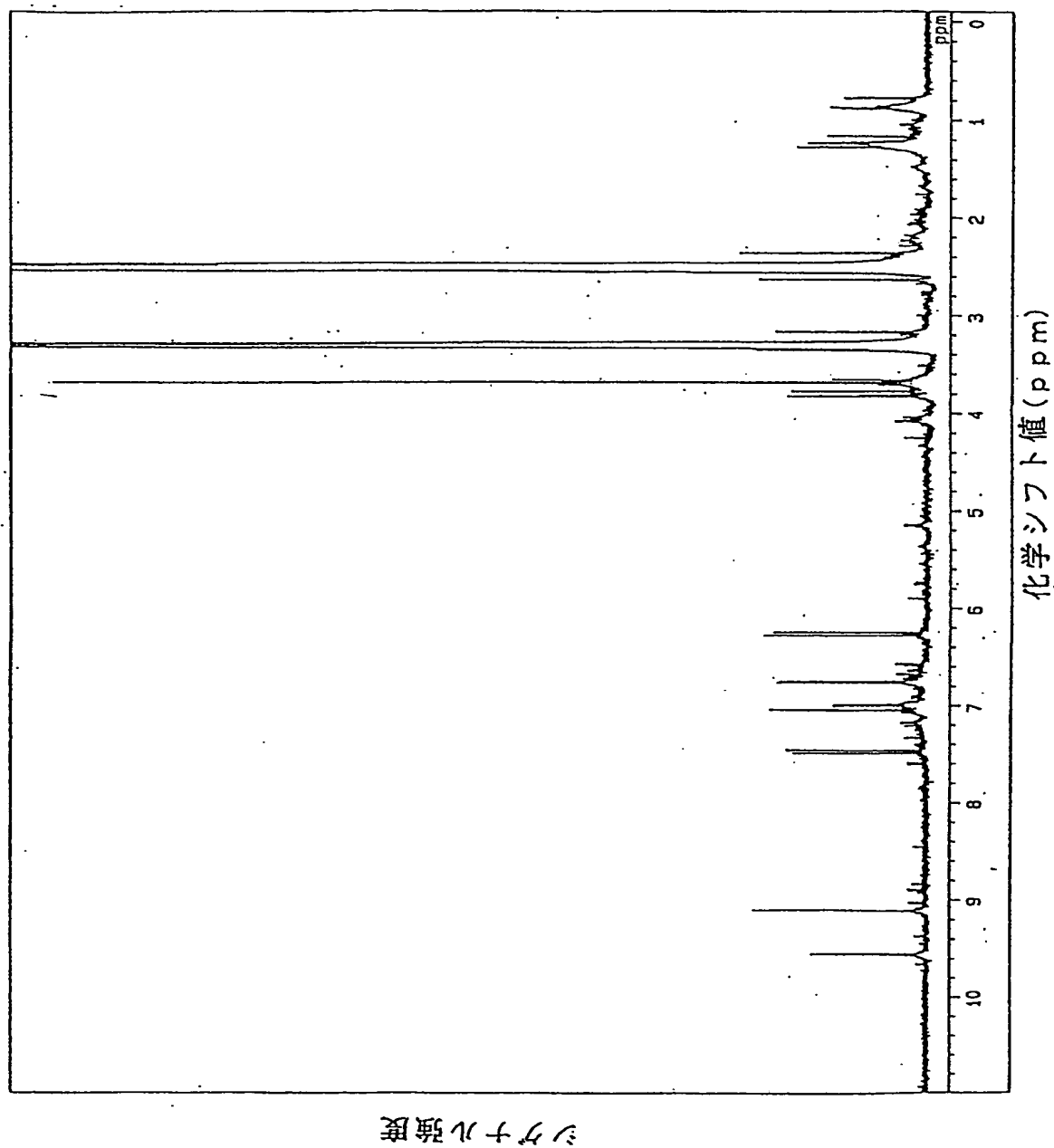
1 9. 金属が鉄、マンガン、マグネシウム、銅、亜鉛、銀、金、アルミニウム、カルシウム、ニッケル、コバルトからなる群より選択される少なくとも 1 種であり、金属塩が前記金属を含んでなる塩であり、金属イオンが前記金属のイオンである請求項 1 7 または 1 8 記載の組成物。

2 0. 成長因子産生増強作用を有する請求項 1 7 ～ 1 9 いずれか記載の組成物。

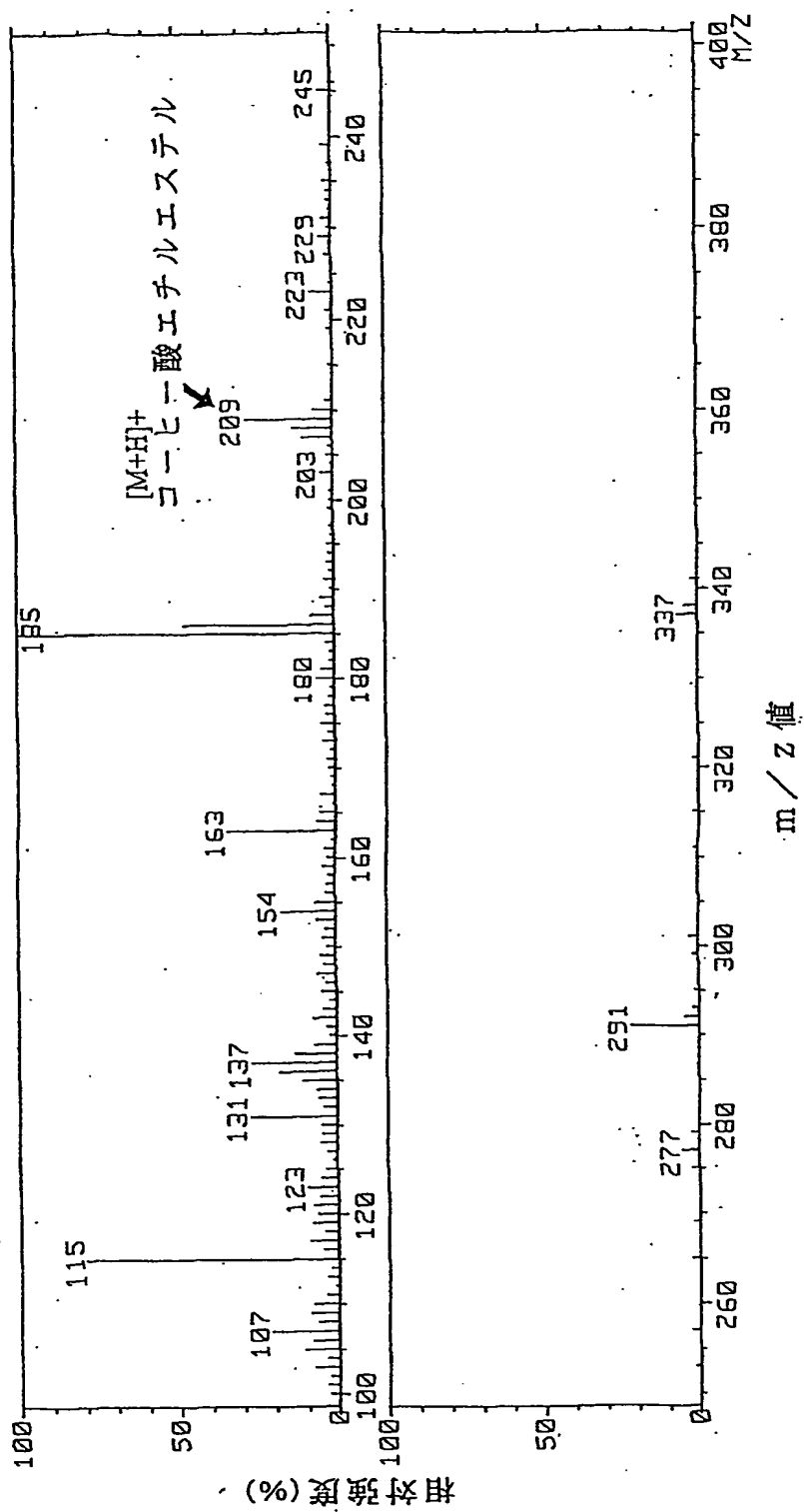
2 1. 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である請求項 2 0 記載の組成物。



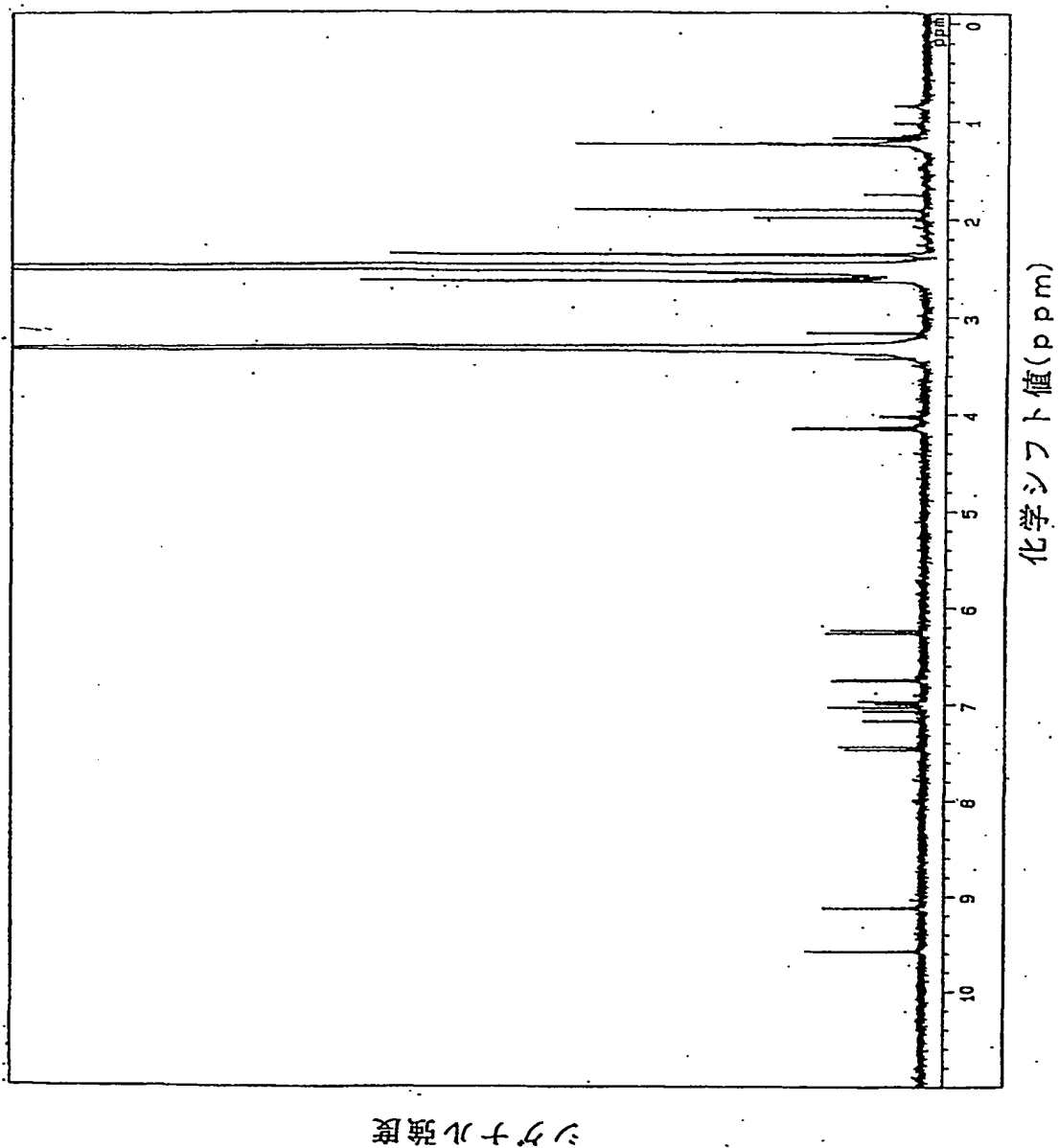
第 1 図



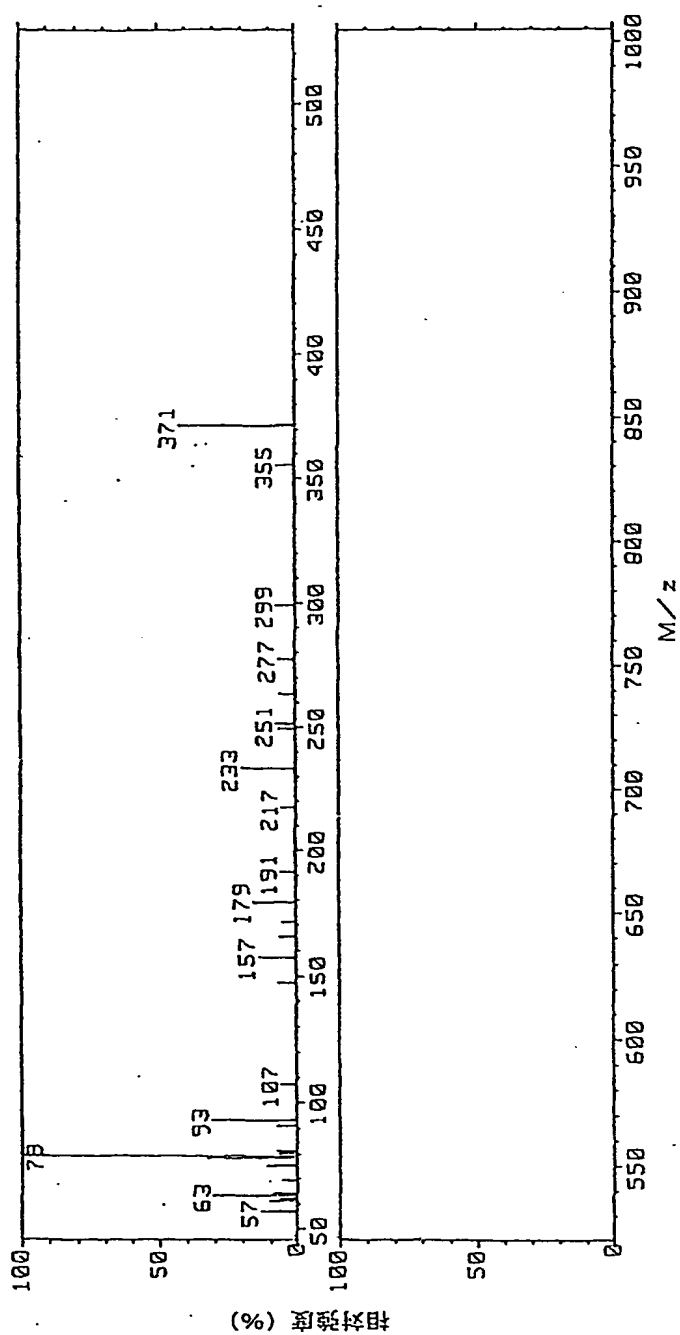
第 2 図



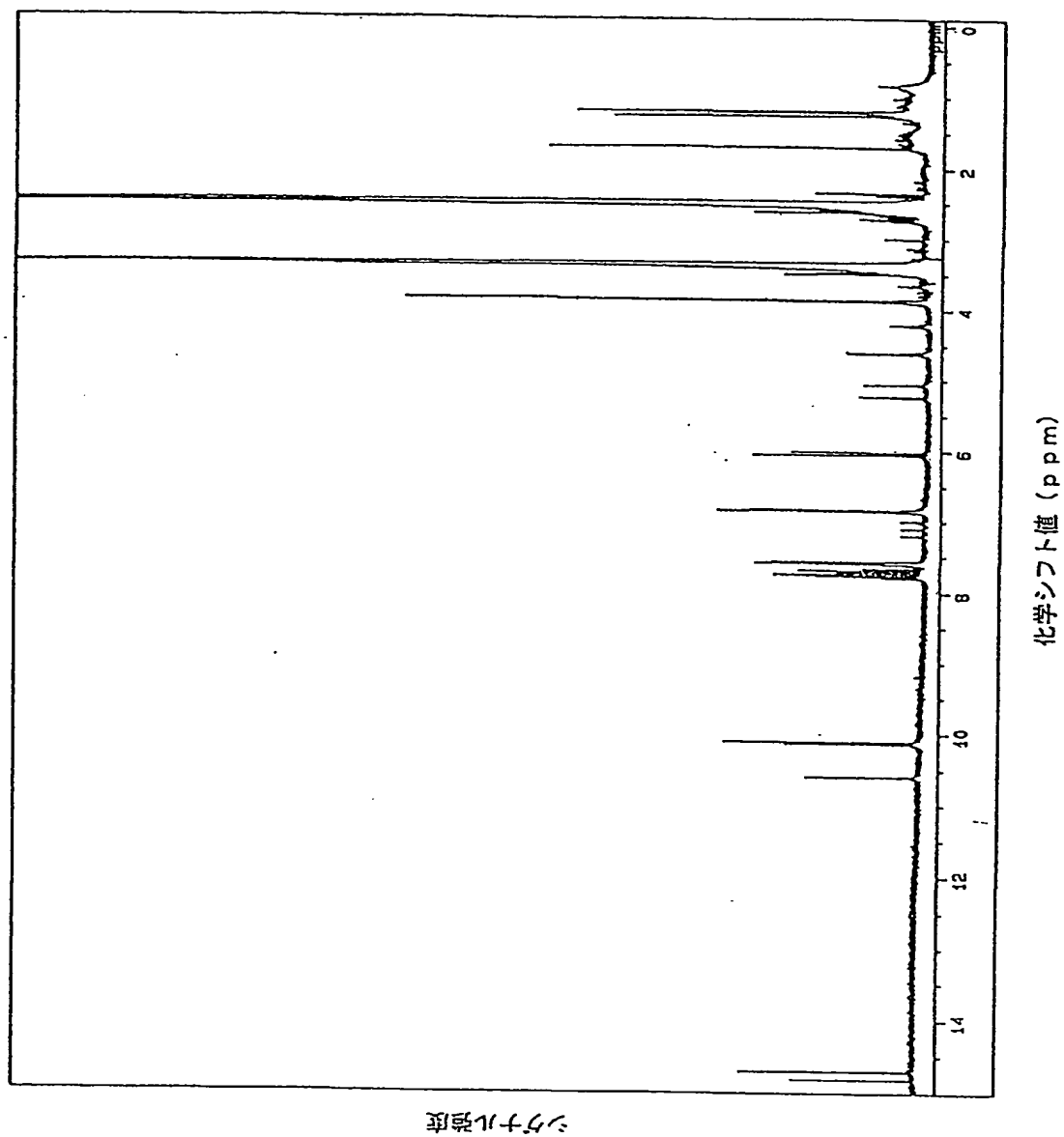
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/12, 31/216, 31/352, 31/7024, A61P25/00, 1/16, 43/00, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/12, 31/216, 31/352, 31/7024, A61P25/00, 1/16, 43/00, A23L1/30, A61L9/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 4-210643, A (Kitsuen Kagaku Kenkyu Zaidan), 31 July, 1992 (31.07.92) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.118:27448	1, 2, 5, 8
X	JP, 5-78384, A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 March, 1993 (30.03.93) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.119:80203	1-3, 5, 8
X Y	JP, 2000-53575, A (Amino Appu Kagaku K.K.), 22 February, 2000 (22.02.00) (Family: none)	1-6, 8 9-16
X Y	JP, 11-80009, A (seiwa Yakuhin K.K.), 23 March, 1999 (23.03.99) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.130:257332	1, 2, 5, 6, 8 9-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 July, 2001 (03.07.01)

Date of mailing of the international search report
17 July, 2001 (17.07.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03075

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 10-245342, A (Mitsui Norin K.K.), 14 September, 1998 (14.09.98) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.129:280979	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 10-175858, A (Itouen K.K.), 30 June, 1998 (30.06.98) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.129:140662	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 2000-60427, A (Howaizu K.K.), 29 February, 2000 (29.02.00) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.132:179885	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 2000-26263, A (Coletica), 25 January, 2000 (25.01.00) & US, 6235294, A & FR, 2778663, A1 & DE, 19922287, A1 & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.131:355899	1, 2, 5, 6 9-16
X Y	JP, 10-175990, A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 June, 1998 (30.06.98) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.129:140663	1, 5, 6, 8 9-16
Y	JP, 4-300836, A (Nippon Mining Co., Ltd.), 23 October, 1992 (23.10.92) (Family: none)	9-16
X Y	JP, 64-68318, A (Kabushiki Kaisha Oota Isan), 14 March, 1989 (14.03.89) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.112:25664	1, 2, 5, 6, 8 9-16
X	WO, 98/11789, A1 (Howard Foundation), 26 March, 1998 (26.03.98), & EP, 930831, A1 & JP, 2001-506579, A	1-3, 5-7, 9-16, 17-21
Y	EP, 481263, A1 (Soc. Prod. Nestle S.A.), 22 April, 1992 (22.04.92), & US, 5139802, A & JP, 4-258255, A	9-16, 17-21
X	JP, 63-132662, A (Matsushita Electric Works, Ltd.), 04 June, 1988 (04.06.88) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.109:134384	17-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/12, 31/216, 31/352, 31/7024, A61P25/00, 1/16, 43/00, A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/12, 31/216, 31/352, 31/7024, A61P25/00, 1/16, 43/00, A23L1/30, A61L9/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 4-210643, A (財団法人喫煙科学研究財団) 31. 7月. 1992 (31. 07. 92)、(ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 118:27448	1, 2, 5, 8
X	JP, 5-78384, A (大正製薬株式会社) 30. 3月. 1993 (30. 03. 93) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 119:80203	1-3, 5, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信



4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . . . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 2000-53575, A(株式会社アミノアップ化学) 22. 2月. 2000 (22. 02. 00)、(ファミリーなし)	1-6, 8 9-16
X Y	JP, 11-80009, A(正和薬品株式会社) 23. 3月. 1999 (23. 03. 99) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 130:257332	1, 2, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 10-245342, A(三井農林株式会社) 14. 9月. 1998 (14. 09. 98) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 129:280979	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 10-175858, A(株式会社 伊藤園) 30. 6月. 1998 (30. 06. 98) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 129:140662	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 2000-60427, A(株式会社ホワイズ) 29. 2月. 2000 (29. 02. 00) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 132:179885	1, 5, 6, 8 9-16
X Y	JP, 2000-26263, A(COLETICA) 25. 1月. 2000 (25. 01. 00) & US, 6235294, A & FR, 2778663, A1 & DE, 19922287, A1 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 131:355899	1, 2, 5, 6 9-16
X Y	JP, 10-175990, A(山之内製薬株式会社) 30. 6月. 1998 (30. 06. 98) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 129:140663	1, 5, 6, 8 9-16
Y	JP, 4-300836, A(日本鉱業株式会社) 23. 10月. 1992 (23. 10. 92) (ファミリーなし)	9-16
X Y	JP, 64-68318, A(株式会社太田胃酸) 14. 3月. 1989 (14. 03. 89) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 112:25664	1, 2, 5, 6, 8 9-16

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/11789, A1 (HOWARD FOUNDATION) 26. 3月. 1998 (26. 03. 98) & EP, 930831, A1 & JP, 2001-506579, A	1-3, 5-7, 9-16, 17-21
Y	EP, 481263, A1 (SOC PROD NESTLE SA) 22. 4月. 1992 (22. 04. 92) & US, 5139802, A & JP, 4-258255, A	9-16, 17-21
X	JP, 63-132662, A (松下電工株式会社) 4. 6月. 1988 (04. 06. 88) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), .DN. 109:134384	17-21